



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA BIOQUÍMICA

REGULACIÓN DE LA CITOCINESIS EN SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE MEDIANTE LA PROTEÍNA ETD1

TESIS DOCTORAL

María Alcaide Gavilán

2011

El Dr. Juan Jiménez Martínez, catedrático del Área de Genética de la Universidad Pablo de Olavide y el Dr. Rafael Rodríguez Daga, profesor titular de Genética de la Universidad Pablo de Olavide,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la licenciada María Alcaide Gavilán titulado “REGULACIÓN DE LA CITOCINEISI EN SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE MEDIANTE LA PROTEÍNA ETD1” ha sido realizado íntegramente por ella bajo nuestra dirección y supervisión, y reúne las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado.

Juan Jiménez Martínez

Rafael Rodríguez Daga

“Cuando crees que conoces todas las respuestas, llega el universo y te cambia las preguntas”

Albert Espinosa

“La vida me ha enseñado que la gente es amable, si yo soy amable; que las personas están tristes, si estoy triste; que todos me quieren, si yo los quiero; que todos son malos, si yo los odio; que hay caras sonrientes, si les sonrío; que hay caras amargas, si estoy amargado; que el mundo está feliz, si yo soy feliz; que la gente es enojona, si yo soy enojón; que las personas son agradecidas, si yo soy agradecido. La vida es como un espejo: si sonrío, el espejo me devuelve la sonrisa. La actitud que tome frente a la vida, es la misma que la vida tomará ante mí. El que quiera ser amado, que ame”.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Bueno, aquí estamos por fin, aunque si lo pienso me parece increíble. Han pasado ya cinco años desde que llegué al laboratorio y me encontré con un grupo peculiar de gente, muchos de los cuales a día de hoy formáis una parte muy importante de mi vida.; ya no sólo somos compañeros sino que aquí tengo a muchos grandes amigos e incluso algunos de vosotros os habéis convertido en mi familia sevillana. Además, todo esto no hubiera sido posible sin vosotros, así que sólo me queda dedicaros este trabajo y dar las gracias por todo lo que aquí he vivido y aprendido.

Gracias Juan por ayudarme desde antes incluso de empezar la carrera. Por el libro de genética que me regalaste, por animarme a descubrir este mundo de la investigación que yo tenía en un segundo plano, por las discusiones y tus puntos de vista y sobre todo por darme la oportunidad de entrar a formar parte de este grupo. He aprendido mucho estos años. Gracias por eso.

A Rafa Daga, gracias por tu codirección; todo esto ha sido mucho más fácil con tu ayuda. Gracias por nuestras eternas discusiones y por apasionarte con el proyecto.

A los demás profes del área: Andrés, Antonio, Víctor, Manolo y Nacho, porque he aprendido mucho de vuestros consejos y opiniones. Gracias Manolo por sacarme siempre una sonrisa y por preocuparte por mí. A ti Víctor, porque a pesar de nuestras diferentes formas de ser me lo he pasado genial contigo. Y a Nacho y Nuri por todos los momentos que hemos pasado juntos.

Realmente ha sido una suerte contar con compañeros como vosotros, porque, qué hubiera sido de mí sin vuestra ayuda cuando no sabía hacer algo, sin vuestros consejos no sólo del laboratorio sino también como amigos, sin los viernes de los caminantes, los cafelitos después de comer, las cervecitas en esos días que nos daban las mil, las fiestas...Hemos compartido tantas cosas...En primer lugar gracias a Aurelia por enseñarme cómo trabajar con levaduras y por darme el relevo de su proyecto; gracias por ser mi madre y mi amiga en Nueva York. A mi mini grupo porque con vosotros ha sido mucho más divertido; gracias Fer por tus ánimos constantes y tu paciencia y gracias Rafilla por hacerme no tirar la toalla. A mis niñas del labo: Valle, Mercedes y Pepa, gracias por nuestra

amistad, porque compartir estos años con vosotras ha sido genial. Nos hemos reído, hemos llorado, pero lo más importante son todos los momentos que me llevo con vosotras; os voy a echar mucho de menos. Gracias a Ramón por los desayunos, el Snow, las Nocheviejas, las cenas, los cines... al final nos hemos entendido, eh??? Gracias a Marivi y a ti por estar ahí cuando os necesitamos. A Alberto porque aquella época mala nos unió; gracias por ser un gran apoyo. A Alfonso por interesarse siempre por los proyectos de los demás. A Victitor por nuestra complicidad, por todos los momentos buenos y malos que tú sabes. A Cris, a Miriam y a Sandra por vuestra alegría y por traer aire fresco al laboratorio. A Silvi por tu ayuda incondicional y por nuestros inicios juntas. A Nacho por ser mi sevillano chungo preferido. A Manolillo por ser tan personaje. A Yasha por su positivismo aquí y en Nueva York y a Javi por estar aquí al final en un momento duro. Gracias Ana María por darme un abracito en mis días malos y por nuestra amistad. A Monje por seguir siendo uno más aunque ya no estés en el labo; gracias por tu cariño. A David, mi compi de facultad, quién nos iba a decir que íbamos a terminar trabajando juntos. Y a ti Ale, gracias por ser una de mis amarillas. Por supuesto, gracias Anabel por tus charlas, tus abrazos y tu alegría y a todos los técnicos un gracias extra por tenerlo todo siempre a punto.

Muchas gracias también a toda la gente del CABD con los que he tenido la suerte de compartir estos años. A Kathy por su gran ayuda en los microscopios y las cenas en su casa. A Belu por ser como mi madre aquí en Sevilla; gracias por preocuparte siempre por mí. Y a todas las personas que han pasado por aquí y han aportado su granito de arena, en especial a Alba, Mari Toñi, Isa, Anita, Blanca y a Juanjo, mi súper compi de piso.

Pero no puedo terminar esto si dar las gracias a muchas otras personas que han sido fundamentales para mí en todo este proceso.

A Cris y a Laura por ser mi vía de escape; gracias por aguantarme en mis días malos, por nuestros viajes, las risas y los llantos... gracias por estar SIEMPRE ahí. Habéis sido de lo mejor que me ha pasado en Sevilla.

A Edu y a Anita porque os habéis convertido en grandes amigos; por nuestras cenas y todos los momentos que nos quedan juntos.

A mi Mari porque sin ti no sé qué habría sido de mí. Gracias por escucharme siempre, por tus consejos, por no regañarme, por venirte a vivir conmigo... Gracias por ser como una hermana para mí (por eso soy la tita prefe de Sarita!!!).

A Maca, María, Irene y Fati, por ser las mejores amigas del cole que alguien puede tener. Gracias por todos estos años juntas y los que nos quedan. Y a Paco, por su comprensión y todo el tiempo que hemos compartido.

A mis niñas de la facu, Paloma, Elena, Lauri y Marta porque sé que estáis orgullosas de mí y por animarme a conseguirlo desde la carrera. Gracias también por todo lo demás.

A mis padres y a mi enana por su apoyo incondicional, y porque sé que aunque me echáis y me vais a echar mucho de menos siempre queréis lo mejor para mí. Os quiero mucho.

Al resto de mi familia, por interesaros y preocuparos siempre por mí. A mis abuelillos.

Y por supuesto, gracias mi niño por TODO. Por los buenos y malos momentos, por quererme tanto, por conservar la ilusión, y por hacer que yo la conserve cuando ya no puedo más. Porque “juntos todo el rato” la vida es mucho más bonita.

Gracias a todos porque habéis hecho esto posible.

A MIS PADRES Y A MI ENANA

A RAFA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Importancia del control de la división celular.....	3
2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como modelo de estudio de la división celular	4
2.1. Ventajas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4
2.2. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	6
3. El ciclo celular	7
3.1. La Mitosis en <i>S. pombe</i>	9
4. Citocinesis en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	11
4.1. Posicionamiento del sitio de división.....	13
4.2. Ensamblaje de los componentes del anillo	14
4.3. Contracción del anillo. Ruta SIN (Septation Initiation Network).....	16
4.3.1. Reguladores de SIN	21
4.3.2. Checkpoint de citocinesis	22
4.4. Formación del septo	23
4.5. Separación de las células hijas	24
5. GTPasas en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	25
5.1. Spg1p, una GTPasa de la familia Ras esencial para la formación del septo en <i>S. pombe</i>	28
5.2. Rho1p, una GTPasa de la familia Rho. Funciones y reguladores.....	29
6. Las proteínas fosfatasa 2A y su función en la regulación de la citocinesis.....	32
 ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	 35
 RESULTADOS.....	 41
CAPÍTULO 1	43
Papel antagónico de Etd1p y PP2A-Pab1p en el control de la citocinesis.	43
1.1. La falta de actividad Pab1p suprime los defectos de crecimiento y septación del mutante <i>etd1</i>	45
1.2. El complejo PP2A-Pab1p regula negativamente a Spg1p.....	47
1.3. Activación de la septación independiente de SIN por <i>pab1-4</i>	49
1.4. Rho1p como activador de la citocinesis.....	52
1.5. Regulación de la actividad de Rho1p por Etd1p y PP2A-Pab1p	60

CAPÍTULO 2	65
Caracterización de diferentes dominios en Etd1p	65
2.1. Análisis informático de la secuencia de Etd1p para identificar su posible función molecular.....	67
2.2. Análisis funcional de Etd1p.....	71
2.2.1. Un dominio N-terminal de Etd1p determina su localización	72
2.2.2. Un dominio C-Terminal de Etd1p determina su actividad molecular	75
2.2.3. Relación entre la localización de Etd1p y su función molecular	77
2.3. La interacción con Rho1p tiene lugar en el extremo C-Terminal de Etd1p	79
2.4. La localización en la membrana de Etd1p no condiciona la activación de la ruta SIN.	82
 CAPÍTULO 3	 87
Coordinación de la citocinesis con la ruta SIN.....	87
3.1. El cierre del anillo de actinmiosina determina el apagado de la ruta SIN.....	89
3.2. Etd1p impide la unión de Cdc16p-Byr4p en uno de los SPBs.....	92
3.3. Pérdida de la asimetría de Cdc7p en ausencia de la actividad quinasa de Sid2p .96	
3.3.1. Construcción y caracterización del mutante <i>sid2-as</i>	97
3.4. Intercomunicación entre los SPBs.....	100
 DISCUSIÓN.....	 103
1. Etd1p como nuevo activador de Rho1p.....	105
2. Inhibición de Rho1p por PP2A-Pab1p	107
3. Caracterización de los dominios de Etd1p.....	108
4. Coordinación entre SIN y citocinesis.....	110
5. Establecimiento de la asimetría en los componentes de SIN	113
 CONCLUSIONES.....	 117
 MATERIALES Y MÉTODOS.....	 121
1. Nomenclatura.....	123
2. Estirpes utilizadas.....	124
3. Medios y condiciones de cultivos.....	128
4. Métodos genéticos.....	129
4.1. Conjugación de cepas para generar dobles mutantes	129

4.2.	Ensayos de crecimiento en gota	130
5.	Técnicas generales de Biología Molecular	130
5.1.	Deleción de <i>pab1</i>	131
5.2.	Construcción de truncados de Etd1p	132
5.3.	Construcción del mutante <i>sid2-as</i>	133
6.	Análisis de proteínas.....	135
6.1.	Western-Blot.....	135
6.2.	Coinmunoprecipitación.....	137
6.3.	Medida de Rho1p activo (GTP-Rho1p).....	137
7.	Técnicas generales de biología celular y microscopía	139
7.1.	Microscopios y técnicas utilizadas	139
7.2.	Análisis de imagen.....	140

BIBLIOGRAFÍA	141
---------------------------	------------

INTRODUCCIÓN

1. Importancia del control de la división celular

Desde que somos pequeños nos enseñan que los organismos nacen, crecen, se reproducen y mueren. La reproducción es una función básica de los seres vivos; es un proceso que permite a las especies la continuidad de la vida, tanto en el tiempo, porque las perpetúa, como en el espacio, porque sustituye a los organismos que mueren por otros y así se mantiene el número de individuos.

Tal y como expresa la teoría celular: *todas las células se forman a partir de células preexistentes*. El crecimiento y desarrollo de los organismos vivos depende del crecimiento y multiplicación de sus células. Este proceso de crecimiento y división de las células es conocido como Ciclo Celular.

El ciclo celular incluye muchos procesos de enorme importancia para la división y la supervivencia de las células. Entre estos procesos cabe destacar la duplicación de los componentes celulares y el material genético, para repartirlo entre las dos células hijas. La precisa y exacta regulación del ciclo celular es esencial para asegurar que las condiciones de división sean favorables. Para ello, en todo este proceso existen una serie de puntos de control que aseguran que las células no se dividan antes de duplicar su material genético, se detengan en caso de que se haya producido daño en su ADN, etc. La falta de estos procesos de control tiene como consecuencias, entre otras, la aparición de alteraciones cromosómicas y de fenómenos de proliferación descontrolados, responsables de enfermedades relacionadas con el desarrollo del individuo, siendo sin duda el cáncer la más severa de todas ellas. Es por ello que el estudio del ciclo celular y sus mecanismos de control ha sido de gran interés para la comunidad científica desde hace décadas y lo sigue siendo en la actualidad.

2. *Schizosaccharomyces pombe* como modelo de estudio de la división celular

2.1. Ventajas de *Schizosaccharomyces pombe*

Gracias a que la naturaleza utiliza los mismos ladrillos para construir organismos tan diferentes como levaduras, moscas, ratones y seres humanos, podemos aprender lo que hacen nuestros propios genes, mediante el análisis de genes similares en "organismos modelos" fáciles de manejar y de rápida reproducción.

Conocimientos fundamentales sobre las células humanas provienen del estudio de organismos tan simples como las levaduras. Los seres humanos conocen y aman a las levaduras desde tiempos remotos. Este pequeño organismo es capaz de producir vino a partir de uvas, cerveza a partir de la cebada o pan a partir de harina. Las levaduras se encuentran en grandes cantidades, son baratas, fáciles de cultivar y en condiciones favorables se dividen en muy poco tiempo. Además, estos organismos unicelulares pueden hacer casi todo lo que hacen las células humanas para sobrevivir: transmitir señales desde la superficie de la célula al núcleo, fabricar proteínas, reparar el ADN, etc. Es por estas y otras razones que se las reconozca universalmente como uno de los mejores organismos modelos para realizar estudios de cualquier cosa que suceda dentro de una única célula.

Dentro de las levaduras, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) fue utilizada por primera vez como organismo modelo en los años 50 para el estudio del ciclo celular por Murdoch Mitchison, y en estudios de genética por Urs Leupold. Fue Patrick Lindner quien realizó el primer aislamiento en 1893, a partir de una muestra de cerveza del este de África; de aquí que su nombre "**Pombe**" derive de la palabra cerveza en el idioma Swahili.

Esta levadura es un organismo eucariota unicelular que presenta una forma cilíndrica de 3-4 μm de diámetro y 7-14 μm de longitud (Figura I.1). Crece de forma polarizada por extensión de sus puntas y se divide de forma simétrica mediante fisión generando dos células hijas de idéntico tamaño; es por esto que se conozca como levadura de fisión o *Schizosaccharomyces*. En este aspecto es muy similar citológicamente a las células eucariotas superiores, especialmente si nos referimos al modo de división celular, mediante la formación de un anillo de actinmiosina contráctil en el medio de la célula. Este patrón de crecimiento y división ofrece una oportunidad única para estudiar los mecanismos que establecen la polaridad celular y la citocinesis.

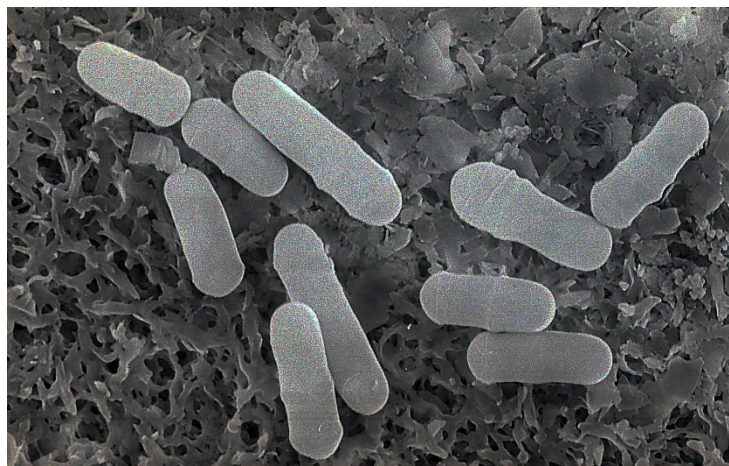


Figura I.1. *Schizosaccharomyces pombe* como organismo modelo. Imagen de *S.pombe* al microscopio electrónico de barrido.

El genoma de *S. pombe*, que está organizado en tres cromosomas, se secuenció por completo hace pocos años (Wood et al., 2002). Además, esta levadura tiene un tiempo de generación de tan sólo 2 ó 3 horas, es fácilmente transformable y tiene una alta frecuencia de recombinación homóloga, lo que hace que su manipulación genética sea relativamente fácil para deletar genes, marcarlos con epítomos, expresar proteínas o visualizar éstas al microscopio fusionadas a GFP. Esto, junto con unas condiciones de cultivo simples que permiten llevar a cabo estudios de biología molecular, celular y genética clásica, hacen de este organismo un modelo de estudio muy cotizado.

2.2. Ciclo de vida de *S. pombe*

La levadura *S. pombe* presenta un ciclo de vida con una fase haploide y otra diploide. Durante la fase haploide, que es la predominante, las células crecen por las puntas y se dividen por fisión mediante la contracción de un anillo de actinmiosina. Tras la contracción del anillo se forma un septo de pared celular que divide a la célula en dos células hijas idénticas.

El crecimiento de las células está bastante controlado. Inicialmente, crecen de manera monopolar, sólo por el polo más viejo (heredado de la célula madre), pero en un momento determinado del ciclo denominado NETO (New End Take Off), pasan a crecer por ambos polos, adquiriendo un patrón de crecimiento bipolar (Mitchison and Nurse, 1985).

Todas las cepas que se utilizan hoy en día para investigación en laboratorios provienen de un aislado de fermento de uva realizado por A. Osterwalder. Este aislado era una cepa homotámica que alternaba entre dos sexos, h+ y h-, y que fue posteriormente manipulada para que sólo expresase los factores asociados a uno de los dos caracteres. Cuando dos células haploides de tipo sexual opuesto se encuentran en un medio pobre en nutrientes, comienza el proceso de conjugación donde las células primero fusionan su citoplasma y posteriormente se forma el cigoto mediante fusión de los núcleos. Normalmente, estos cigotos diploides sufren meiosis, y los cuatro núcleos resultantes dan lugar a un asca con cuatro ascosporas. Cuando las condiciones del medio son las adecuadas, la espora germina, dando lugar a una célula haploide. El cigoto puede también mantener un ciclo vegetativo diploide si se transfiere a un medio rico en nutrientes (Figura I.2)

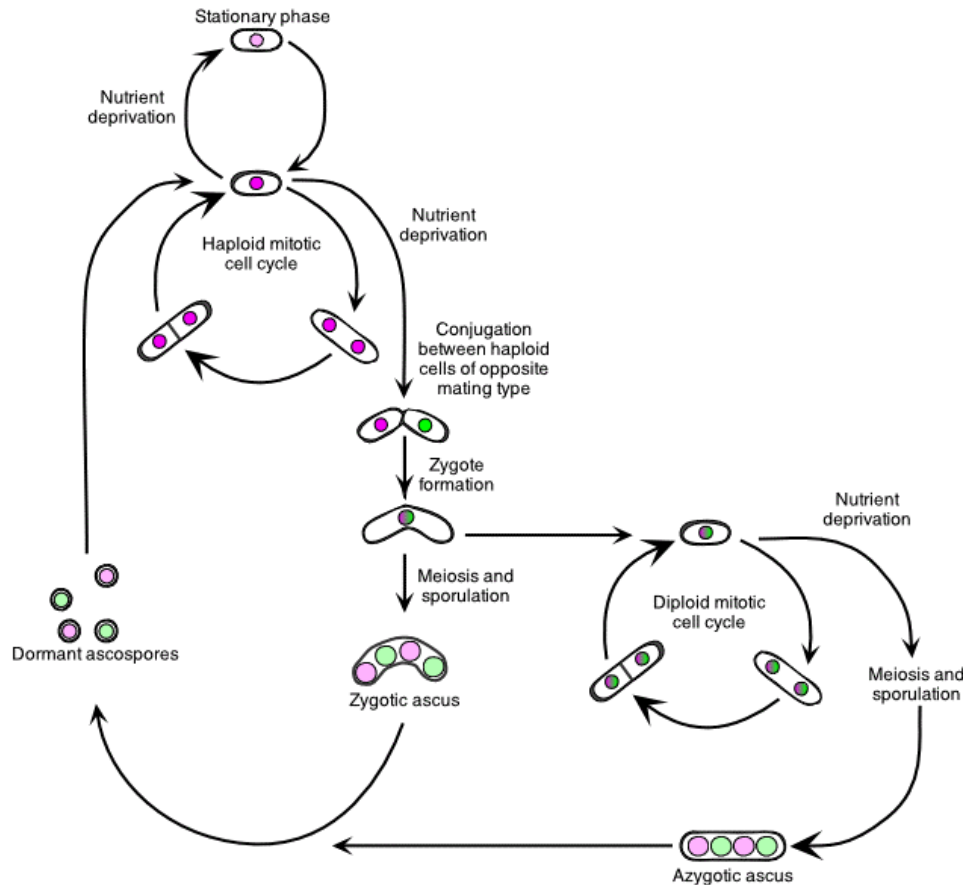


Figura I.2. Ciclo haploide y diploide de *S. pombe*. El color rosa y verde indican los dos tipos sexuales diferentes (h^+/h^-).

3. El ciclo celular

El ciclo celular es uno de los procesos más estudiados en la biología de la célula y esto es debido, principalmente, a que un fallo en la regulación de este proceso puede ocasionar enfermedades tan severas y por desgracia cada vez más frecuentes, como el cáncer. Dado el grado de conservación evolutiva de los mecanismos de control del ciclo celular entre *S. pombe* y humanos, el estudio del ciclo celular en un organismo relativamente simple como *S. pombe* es y ha sido útil para entender el comportamiento de las células tumorales y las causas de su desregulación (Nurse, 1990).

Parte importante del conocimiento que hoy día tenemos sobre el ciclo celular viene de las aportaciones de Leland H. Hartwell, Paul N. Nurse y R. Timothy Hunt, quienes fueron galardonados con el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2001.

Durante la vida celular, las células pasan por un ciclo regular de crecimiento y división. A esta secuencia de fases es a lo que denominamos ciclo celular y a grandes rasgos consta de un período de crecimiento (interfase) y un período de división celular (mitosis).

Podemos distinguir diferentes fases dentro del ciclo celular eucarionte. La duración de cada una de estas fases varía de unos tipos celulares a otros e incluso existen variaciones dentro de un mismo tipo celular.

- **Fase G₁:** es la primera fase de crecimiento de las células. Las células hijas recientemente originadas presentan una gran actividad metabólica produciéndose un aumento acelerado del tamaño celular y de los orgánulos.
- **Fase S:** es una fase de síntesis de ADN, en la que las células duplican el material genético para el posterior reparto entre las dos células hijas.
- **Fase G₂:** es la segunda fase de crecimiento, en la que la célula ensambla las estructuras necesarias para la separación de las células hijas. Además, en esta fase la célula repara los daños que se hayan producido en el ADN.
- **Fase M:** es la fase de división celular o mitosis. En esta fase la célula reparte el material genético entre las dos células hijas y divide el citoplasma mediante un proceso conocido como citocinesis.

El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza porque los periodos de replicación del DNA, o fase S, y la fase de segregación de los cromosomas durante la mitosis, están separados por un largo periodo G₂ que ocupa aproximadamente el 70% del ciclo (Figura I.3). Además, a diferencia de las células eucariotas superiores, la mitosis de *S. pombe* es cerrada, es decir, la membrana nuclear no se disgrega durante el reparto de los cromosomas (Heath and Rethoret, 1980; Yoshida and Sazer, 2004).

El final de la mitosis se coordina con la contracción de un anillo de actinmiosina y la formación de un septo de pared celular en el centro de la célula (citocinesis), para formar dos células hijas cada una de ellas con un solo núcleo. La citocinesis coincide temporalmente con la Fase S, teniendo ya todas las células recién separadas de su hermana un contenido 2c de DNA. Es por ello que la fase G1, en la que las células todavía no han replicado su DNA, es casi indetectable en un ciclo vegetativo de *S. pombe* (Nurse, 1994).

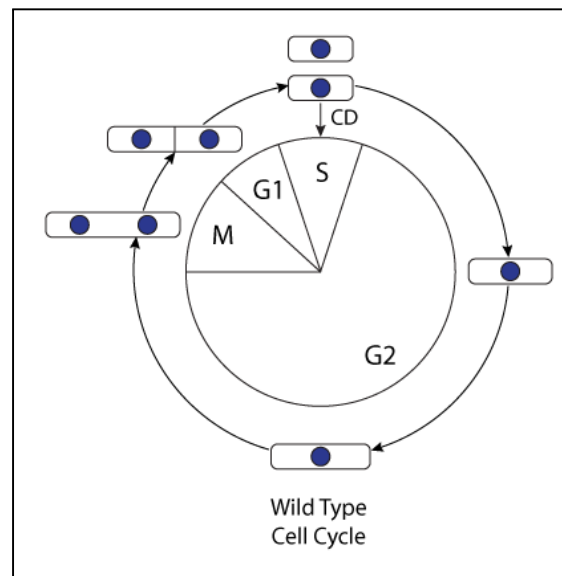


Figura I.3. Ciclo celular de *S. pombe*. (Novak et al., 1998)

3.1. La Mitosis en *S. pombe*

Como ya he mencionado, la Mitosis es el proceso por el cual se produce la segregación del material genético entre las dos futuras células hijas. La mitosis conlleva una reorganización drástica del ADN (condensación de los cromosomas), así como de las estructuras encargadas de segregar este material genético (los microtúbulos, MTs). Estas modificaciones son los primeros fenómenos evidentes que denotan el inicio de la mitosis.

La mitosis puede subdividirse en cuatro fases: **profase**, **metafase**, **anafase** y **telofase**.

- **Profase:** es la primera etapa de la mitosis, que se inicia con la activación por parte de la quinasa Cdc2p de una serie de proteínas como Plo1p, responsables de iniciar el proceso, activando el ensamblaje del huso mitótico y la organización del anillo de división, entre otros eventos (Nigg, 2001; Tanaka et al., 2001). A su vez, otra quinasa como es Ark1p, se encarga de disparar la compactación del DNA al inicio de mitosis (Petersen et al., 2001).
- **Metafase:** en este estadio la célula presenta un huso mitótico o spindle en el que los dos centrosomas o SPBs (Spindle Pole Bodys) se encuentran inmersos en la membrana nuclear y enfrentados el uno al otro (Ding et al., 1997). Una vez reorganizados los MTs para formar el huso mitótico, en esta fase se procede a la captura de los cromosomas mediante la unión del huso mitótico a los cinetocoros, una estructura proteica ensamblada en los centrómeros de los cromosomas (Desai, 2000). Al igual que ocurre en otros eucariotas, *S. pombe* posee un sistema de control para comprobar que todos los cromosomas están unidos correctamente al huso mitótico. Este control se conoce como el *checkpoint del spindle* o SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) (Gardner and Burke, 2000; Kadura and Sazer, 2005). Una vez que los cromosomas han sido correctamente capturados se inicia la anafase.
- **Anafase:** en la transición metafase-anafase se activa el complejo APC (Anaphase Promoting Complex). Este complejo se encarga de poli-ubiquitinar a una serie de proteínas para que sean degradadas por el proteosoma. Entre los sustratos del APC se encuentran la securina (Cut2p), cohesina que mantiene unidas las cromátidas hermanas y la ciclina B (Cdc13p). Por tanto, gracias a la acción del APC, en esta fase de la mitosis se produce la separación física de las cromátidas hermanas hacia cada polo del huso (Funabiki et al., 1996). Esta separación se produce gracias al crecimiento del haz de MTs que se interpone entre los dos SPB. Además, al ser la mitosis de *S. pombe* cerrada, junto con los cromosomas también se separan el resto de los componentes nucleares, generándose al final de anafase dos núcleos hijos que son arrastrados hasta los extremos de la

célula (Hagan, 1998). Por otro lado, la degradación de la ciclina Cdc13p permite la salida de mitosis y el inicio de la citocinesis (Holloway et al., 1993; Irniger et al., 1995; Peters, 2006).

- **Telofase:** en esta última fase de la mitosis en la que las células presentan los dos núcleos en polos opuestos, se produce el desensamblaje del huso mitótico. Esta fase está coordinada con la citocinesis, proceso por el cual se forma un anillo de actinmiosina en el centro de la célula que se contrae, a la vez que se va depositando material de pared celular para formar un septo que divide a la célula en dos células hijas (Moser and Russell, 2000).

4. Citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe*

Como ya hemos visto, la citocinesis es el proceso por el cual las células, tras la separación de los cromosomas, dividen el citoplasma para dar lugar a dos células hijas. Por tanto, es fundamental que este proceso esté coordinado espacial y temporalmente con la mitosis para asegurar la correcta segregación cromosómica y el reparto equitativo de material celular entre las dos células hijas (Figura I.4).

Tanto en células animales como en levaduras, la citocinesis requiere la formación de un anillo contráctil de actomiosina (CAR), en la región media de la célula. Muchos de los componentes que intervienen en la formación de este anillo están conservados, por lo que *S. pombe* ha sido y es, un buen modelo para el estudio de este proceso. Pero en levaduras, además, la citocinesis va acompañada de una síntesis de pared celular que forma un septo de separación entre las dos células hijas.

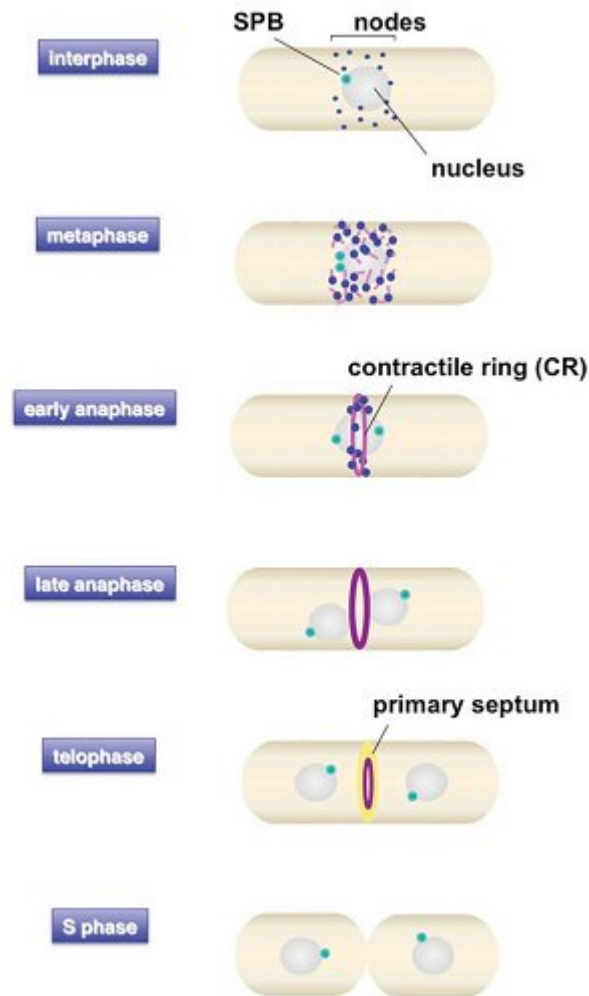


Figura I.4. Coordinación de la citocinesis y la mitosis en *S. pombe*. (Goyal et al., 2011)

La búsqueda y el estudio de mutantes con problemas en citocinesis han ayudado a entender mejor este proceso (Balasubramanian et al., 1998; Gould and Simanis, 1997; Nurse et al., 1976). Así, podemos distinguir varias etapas:

- Posicionamiento del sitio de división
- Ensamblaje de los componentes del anillo
- Contracción del anillo
- Formación del septo
- Separación de las células hijas

4.1. Posicionamiento del sitio de división

S. pombe se divide simétricamente por el ecuador de la célula. Pero ¿cómo sabe la célula dónde está el centro y que es ahí donde debe montar el anillo? La posición del núcleo juega un papel importante en esta decisión. Esta posición viene determinada por un mecanismo dependiente de los microtúbulos interfásicos que recolocan constantemente el núcleo para mantenerlo en el centro de la célula (Daga and Chang, 2005; Tran et al., 2000).

Se sabe que la proteína Mid1p es la principal responsable de la localización del anillo de actinmiosina, entre otras cosas, porque mutantes en este gen causan la deslocalización de todos los componentes del anillo, y el septo se forma en esa posición deslocalizada (Bahler et al., 1998a; Sohrmann et al., 1996; Wu et al., 2003). Durante interfase, Mid1p se localiza en el núcleo (Almonacid et al., 2009; Paoletti and Chang, 2000) y en una débil banda anclada a la región cortical media mediante la quinasa Cdr2p (Almonacid et al., 2009). Al inicio de la mitosis, Mid1p sale del núcleo en forma dependiente de la quinasa Plo1p (Bahler et al., 1998a; Paoletti and Chang, 2000), y se localiza abundantemente en la región cortical media donde atrae a la miosina tipo II para el posterior ensamblaje de todos los componentes del anillo de actinmiosina (Motegi et al., 2004; Wu et al., 2003).

Otra quinasa necesaria para que la división tenga lugar en la región central de la célula es Pom1p, que regula la posición donde se va a formar el septo ejerciendo una restricción espacial sobre Mid1p, ya que regula su exclusión de los polos (Bahler and Pringle, 1998). Pom1p regula la posición del plano de división y la progresión del ciclo celular a través de la regulación negativa de Cdr2p (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009). (Figura I.5)

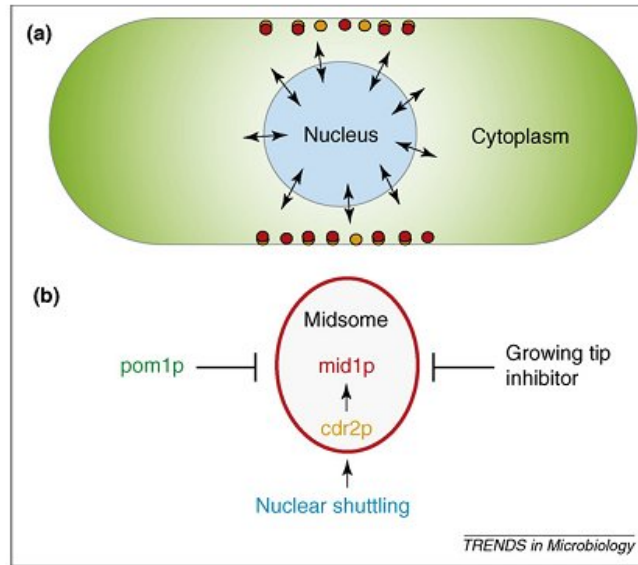


Figura I.5. Modelo de posicionamiento del anillo. (Bathe and Chang, 2009)

4.2. Ensamblaje de los componentes del anillo

Gracias a estudios de microscopía mediante proteínas marcadas con fluorescencia se ha conseguido una cinética y un estudio temporal de la localización de las proteínas que dan lugar al anillo de actinmiosina (Wu et al., 2003). El anillo de división es una estructura altamente dinámica compuesta por más de 20 proteínas. Existen dos modelos actualmente para explicar el ensamblaje del anillo (Figura I.6).

- El primer modelo se basa en la llegada gradual de los distintos componentes a la zona media de la célula. Justo antes de iniciarse la mitosis, y una vez localizado Mid1p en la zona cortical media, se inicia el reclutamiento de nuevas proteínas citoesqueléticas. Las primeras proteínas reclutadas por Mid1p son la miosina tipo II (formada por una cadena pesada Myo2p y dos cadenas ligeras, Cdc4p y Rlc1p) y la proteína IQGAP, Rng2p (like actin crosslinking protein). Recientemente se ha demostrado que Plo1p fosforila a Mid1p para propiciar la asociación de estas proteínas, una vez iniciada la mitosis (Almonacid et al., 2011). Estas proteínas se localizan formando una banda difusa de “nodos” alrededor de la zona de división (Wu and Pollard, 2005; Wu et al., 2006). Posteriormente, se incorporan Cdc12p, formina

responsable de la formación de cables de actina (Pelham and Chang, 2002) y Cdc15p (Bahler et al., 1998a; Coffman et al., 2009; Skau et al., 2009; Sohrmann et al., 1996; Wu et al., 2003).

Una vez iniciada la mitosis, la formina Cdc12p y la profilina Cdc3p, comienzan la formación de los filamentos de actina que se asocian a la tropomiosina (Cdc8p) para elongarse rápidamente (Skau et al., 2009). Esos filamentos se asocian con otros nodos permitiendo la formación y compactación del anillo (Coffman et al., 2009; Stark et al., 2010; Vavylonis et al., 2008). La actinina Ain1p y la proteína Rng2p se encargarán de unir los filamentos de actina para formar haces durante el ensamblaje del anillo (Takaine et al., 2009; Wu et al., 2001).

- El segundo modelo se basa en los resultados que indican que la falta de Mid1p y nodos en la zona cortical media no producen un defecto en la formación del anillo (Chang et al., 1996; Hachet and Simanis, 2008; Huang et al., 2008; Sohrmann et al., 1996). El ensamblaje del anillo en este caso depende de la ruta SIN (*Septation Initiation Network*), una ruta de transducción de señales conservada que dispara la contracción del anillo y la formación del septo de división al final de anafase (Wolfe and Gould, 2005). Según este modelo, y bajo ciertas condiciones, los cables de actinmiosina pueden unirse formando anillos a partir de un sólo punto del córtex (Arai and Mabuchi, 2002; Mishra and Oliferenko, 2008). En ausencia de Mid1p, los anillos quedan desorganizados y desplazados de su posición central, aunque esos defectos en la organización pueden ser suprimidos si se retrasa la formación del septo (Chang et al., 1996; Sohrmann et al., 1996). El mecanismo de la ruta viaja a través de la fosfatasa Clp1p, que se encarga de defosforilar a Cdc15p en el citoplasma. La actividad de Clp1p está disparada a su vez por la ruta SIN (Clifford et al., 2008; Chen et al., 2008; Karagiannis et al., 2005; Mishra et al., 2005). Cdc15p se une al córtex y recluta a la formina Cdc12p, a la paxilina Pxl1p y a Fic1p para promover la estabilidad del anillo (Carnahan and Gould, 2003; Roberts-Galbraith et al., 2009).

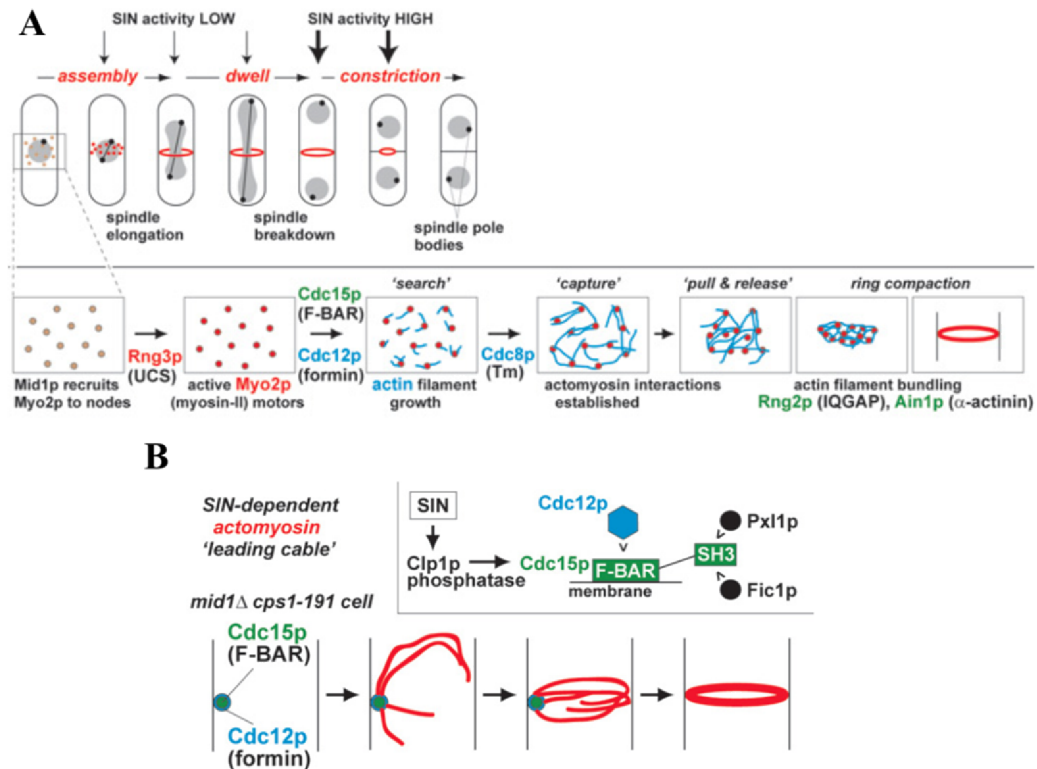


Figura I.6. El ensamblaje del anillo de actinmiosina. A) Modelo de “búsqueda y captura”. B) Modelo del “cable principal” (Lord, 2010).

4.3. Contracción del anillo. Ruta SIN (Septation Initiation Network)

Ya hemos visto que tanto las levaduras como las células animales, usan un anillo de actinmiosina para dividirse. La composición de este anillo es muy similar en todos ellos, sin embargo, tanto el orden de ensamblaje de estos componentes, como el mecanismo por el cual se inicia la contracción varía de unos a otros (Guertin et al., 2002a). Esto, probablemente refleje la necesidad del anillo de coordinarse con otros procesos como la determinación del sitio de división o la formación de la nueva membrana y el septo.

En células animales, la contracción y el posterior desensamblaje del anillo requieren la fosforilación de las miosinas (Burgess, 2005). En este proceso interviene la GTPasa RhoA que activa a la quinasa ROCK para que fosforile a la miosina de tipo II permitiendo así la activación de su función motora. RhoA también interviene en la activación de las forminas encargadas de la polimerización de actina del anillo (Glotzer, 2005; Piekny et al., 2005).

Sin embargo, en *S. cerevisiae* las miosinas no parecen jugar un papel esencial en este proceso de contracción (Bi et al., 1998; Wolfe and Gould, 2005).

En *S. pombe* se ha demostrado que la proteína Rng3p participa en el plegamiento de las miosinas de tipo II, estimulando su actividad motora, lo que sugiere que podría estar implicada en la activación de la contracción del anillo (Lord et al., 2008). Por otro lado se ha visto que la quinasa Pak1p/Shk1p fosforila a la cadena ligera reguladora de la miosina de tipo II, Rlc1p, inhibiéndola, para que la citocinesis no se produzca antes de la separación del material genético (Loo and Balasubramanian, 2008). Pak1p/Shk1p es un efector de la GTPasa Cdc42p, la cual localiza en el sitio de división durante la citocinesis dependiente de la proteína Hob3p. La ausencia de Cdc42p en el sitio de división en una cepa Hob3 Δ , podría ser la causa de que la contracción del anillo esté retrasada en esta cepa, proponiéndose así que Cdc42p participaría también en la contracción del anillo de actomiosina (Coll et al., 2007).

En *S. pombe*, la contracción del anillo es simultánea a la formación de la nueva membrana y a la deposición del material del septo. Aunque el anillo de actomiosina ya está formado al comienzo de la anafase, su contracción y la formación del septo sólo se producen cuando los núcleos se han separado y el huso mitótico se desensambla, asegurando así un correcto reparto del material genético entre las células hijas. Por tanto, estos procesos deben estar estrictamente coordinados (Krapp et al., 2004; Simanis, 2003). Esta coordinación es llevada a cabo por una cascada de señalización denominada **Ruta SIN** (Septation Initiation Network), que coordina la finalización de la mitosis con el proceso de contracción del anillo y la síntesis del septo (Balasubramanian et al., 2000). Esta ruta está formada por una cascada de quinasas de serina treonina, cuya señal es disparada por la GTPasa Spg1p, que se encargan de llevar la señal necesaria para la contracción desde los SPBs al centro de la célula, donde se encuentra el anillo de división.

La mayoría de las proteínas implicadas en esta ruta se localizan en los SPBs (Figura I.7) (Krapp et al., 2004). Las proteínas Ppc89p, Cdc11p y Sid4p sirven de anclaje para la unión del resto de las proteínas a los SPBs (Chang and Gould, 2000; Krapp et al., 2001; Morrell et al., 2004; Rosenberg et al., 2006; Tomlin et al., 2002).

Estas proteínas localizan en el SPB a lo largo de todo el ciclo celular y se ha visto que esta localización es también importante para el papel de SIN en el ensamblaje del anillo (Hachet and Simanis, 2008).

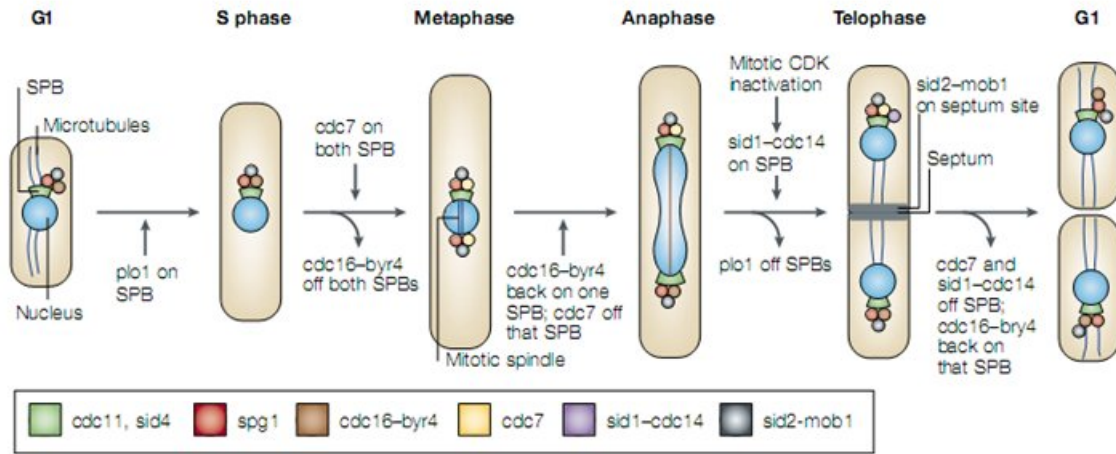


Figura I.7. Localización de los componentes de la ruta SIN a lo largo del ciclo celular. (Bardin and Amon, 2001).

La señalización de la ruta SIN está controlada por una GTPasa de la familia Ras, Spg1p (Schmidt et al., 1997). Esta GTPasa está regulada a su vez por otras dos proteínas, Byr4p y Cdc16p, que actúan juntas como GAP (GTPase-activating protein) para inhibir la actividad de Spg1p mediante la hidrólisis del GTP (Furge et al., 1998). Cdc16p es quien presenta la actividad GAP, mientras que Byr4p actúa como andamio, pero ambas proteínas deben estar presentes en el SPB para poder inhibir a Spg1p (Furge et al., 1998; Krapp et al., 2008). No se ha encontrado ni bioquímicamente ni por búsqueda de mutantes ningún GEF (guanine nucleotide exchange factor) que active a Spg1p por el recambio de GDP por GTP, aunque se ha demostrado que la proteína Etd1p, que se localiza en las puntas de la célula y en el sitio de división (Daga et al., 2005) activa Spg1p cuando los SPBs se acercan a las puntas de la célula (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). La activación inicial de la ruta es llevada a cabo por la quinasa mitótica Plo1p (Tanaka et al., 2001), lo que supone un perfecto nexo de unión para la coordinación entre la mitosis y la citocinesis. Byr4p se hiperfosforila justo antes de septación (Krapp et al., 2008) y se ha demostrado que Plo1p fosforila a Byr4p, proponiéndose que esta fosforilación promovería la expulsión de Byr4p de los SPBs (Johnson and Gould., 2011).

Durante interfase, Cdc16p-Byr4p se localiza en el SPB y por tanto Spg1p permanece en su forma inactiva. Cuando las células entran en mitosis, la actividad quinasa de Plo1p es máxima (Tanaka et al., 2001), lo que supone la hiperfosforilación de Byr4p y la expulsión del complejo Cdc16p-Byr4p del SPB. Por tanto Spg1p alcanza su forma activa (Spg1p-GTP) en el SPB y en los dos SPBs cuando éstos se duplican. Durante anafase B, donde la actividad de Plo1p decae, Cdc16p-Byr4p localiza en un solo SPB, donde Spg1p está inactivo, dando lugar a una asimetría en la activación de la ruta SIN.

Cdc7p, la primera quinasa de esta ruta, sólo es capaz de unirse a Spg1p cuando ésta se encuentra en su estado activo (unido a GTP). Por tanto, en ausencia de actividad Cdc16p-Byr4p, Cdc7p se une al SPB y dispara la cascada de quinasas. Cdc7p recluta a Sid1p y a su proteína reguladora Cdc14p (Fankhauser and Simanis, 1993; Guertin et al., 2000). A su vez este complejo, Sid1p-Cdc14p, es el encargado de activar a la última quinasa de la ruta, Sid2p (Hou et al., 2000; Salimova et al., 2000; Sparks et al., 1999). El complejo Sid2p-Mob1p es el único componente de la ruta SIN que localiza en los SPBs y en el sitio de división. La activación por parte de Sid1p hace que Sid2p-Mob1p viaje al anillo momentos previos a la contracción. Por tanto, se supone que es este complejo el encargado de transmitir desde el SPB a la zona media, la señal de contracción del anillo y síntesis del septo. (Figura I.8)

En cuanto a las dianas de Sid2p, hasta ahora no se han identificado dianas directas de la ruta SIN que puedan promover la contracción del anillo. Se ha propuesto que Etd1p podría ser una posible diana. Esta proteína localiza en las puntas de la célula en interfase y en la transición metafase-anafase se relocaliza a la zona media de la célula, pero este reclutamiento de Etd1p al anillo, requiere la formación de éste y la actividad SIN. Esto, junto a que Etd1p interacciona con Cdc15p en el anillo, hacen de esta proteína un buen candidato para conectar la ruta SIN con la citocinesis (Daga et al., 2005). Otro posible sustrato podría ser la subunidad catalítica de la $\beta(1,3)$ -glucán sintasa, Bgs1p, ya que su localización en la zona media también depende de la activación de la ruta SIN (Cortes et al., 2002; Liu et al., 2002). Y también es posible que pueda estar regulando a la subunidad reguladora del complejo β -glucán sintasa, Rho1p, o a su GEF Rgf3p, que participa

en citocinesis, ya que su sobreexpresión suprime los defectos de la cepa mutante *sid2-250* (Jin et al., 2006; Tajadura et al., 2004).

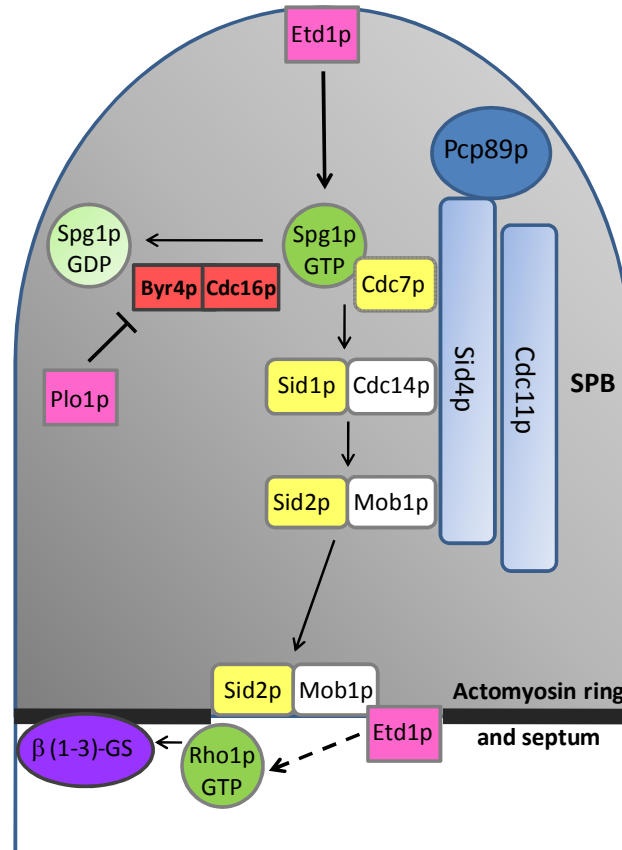


Figura I.8. Esquema de la Ruta SIN. Las GTPasas están representadas en verde; las quinasas de la cascada en amarillo con sus proteínas acompañantes en blanco; los anclajes en azul; los activadores de la ruta en rosa y los inhibidores en rojo.

Los mutantes en que la ruta SIN se encuentra inactiva, como son las cepas que presentan pérdida de función de Spg1p, de Cdc11p, de Sid4p o de cualquiera de las quinasas de la ruta o de sus proteínas asociadas, presentan un fenotipo de células alargadas y multinucleadas. En estos mutantes, el anillo de actomiosina se forma correctamente pero no se contrae y termina por desensamblarse, de tal manera que no se forman septos. Por el contrario, los mutantes GAP en los que la ruta está permanentemente activa, forman múltiples septos situados al azar en una sola ronda de mitosis (Krapp et al., 2004; Simanis, 2003).

4.3.1. Reguladores de SIN

La regulación de la ruta SIN es fundamental para la coordinación de la citocinesis con el ciclo celular. Por esto existen otras proteínas que regulan, de una manera u otra, la progresión de esta ruta.

Dma1p regula la ruta negativamente (Guertin et al., 2002b; Murone and Simanis, 1996). Esta proteína se une al SPB a través de Sid4p e impide la localización de Plo1p en esta estructura. Dma1p también aparece en el anillo de actinmiosina durante anafase, aunque su función aquí se desconoce.

Otro regulador negativo de la ruta es **Cdc2p**. El reclutamiento de Sid1p por parte de Cdc7p no sólo requiere de una ruta SIN activa, sino que necesita que la actividad quinasa de Cdc2p sea baja (Guertin et al., 2000; Wheatley et al., 1997). De esta forma se asegura que la división celular no tenga lugar hasta el final de la mitosis.

Zfs1p (Beltraminelli et al., 1999) y **Scw1p** (Jin and McCollum, 2003; Karagiannis et al., 2002) también se han descrito como reguladores negativos de la septación. Zfs1p es una proteína con dedos de zinc y Scw1p es una proteína de unión a ARN. La falta de estas proteínas rescata a los mutantes de citocinesis, aunque no se conocen sus mecanismos de actuación.

El complejo **γ tubulina** es esencial para la nucleación de los microtúbulos en el SPB y parece estar afectando negativamente a la ruta SIN a nivel de Sid1p. Pero los mecanismos moleculares implicados en este proceso tampoco se conocen (Vardy et al., 2002).

Además de estos reguladores, varias proteínas fosfatasas participan en la regulación de la ruta SIN. **Clp1p/Flp1p** participa en el checkpoint de citocinesis, mientras que las subunidades reguladoras B' de la fosfatasa tipo 2A, **Par1p** y **Par2p**, se han descrito como reguladores negativos de SIN, aunque resultados obtenidos con diferentes subunidades reguladoras de PP2A hace que se pueda pensar que esta fosfatasa pueda actuar a diferentes niveles en la ruta de citocinesis, jugando un papel de regulación tanto positivo como negativo (Jiang and Hallberg, 2001; Le Goff et al., 2001).

4.3.2. Checkpoint de citocinesis

La evidencia de un checkpoint de citocinesis se observó a partir de ciertos mutantes de citocinesis defectivos tanto en la formación del anillo de actinmiosina como en la síntesis del septo. Este checkpoint asegura que la citocinesis finalice antes de iniciarse la próxima división nuclear. Uno de estos elementos, cuya presencia o función en el anillo debe ser estudiada, es la subunidad catalítica de la $\beta(1,3)$ -glucansintasa codificada por el gen *bgs1/cps1/drc1*. Mutantes en este gen son capaces de finalizar la mitosis, pero se detienen con los núcleos bloqueados en G2 y un anillo de actinmiosina estable donde no se inicia la síntesis de septo. Este bloqueo nuclear es liberado tanto por la inactivación de las quinasas Wee1p y Cdc2p como de la ruta SIN (Le Goff et al., 1999; Liu et al., 2000b; Trautmann et al., 2001).

Otro elemento importante implicado en este checkpoint es la fosfoproteína-fosfatasa Clp1p/Flp1p, homóloga a la fosfatasa Cdc14p de *S. cerevisiae*. Clp1p/Flp1p se localiza en el nucleolo y el SPB durante interfase, pero durante la mitosis se va al huso mitótico y al anillo de actinmiosina, volviendo de nuevo al nucleolo cuando la citocinesis se completa. Esta fosfatasa contribuye a reducir la actividad de Cdc2p al final de la mitosis, promoviendo su fosforilación mediante la inactivación y degradación de la fosfatasa Cdc25p (Wolfe and Gould, 2004), lo cual permite que la ruta SIN esté activa hasta que la citocinesis se termina. Cuando falla la citocinesis o se retrasa, SIN mantiene Clp1p fuera del nucleolo hasta que la citocinesis pueda completarse. En un mutante en *bgs1*, Flp1p/Clp1p no vuelve al nucleolo al final de mitosis (Cueille et al., 2001; Trautmann et al., 2001). Además, Clp1p/Flp1p activa la ruta SIN ya que en la cepa mutante *cps1-191*, a temperatura restrictiva, la localización de Cdc7p y Sid1p depende de Clp1p/Flp1p (Trautmann et al., 2001). Esto permite que el anillo de actinmiosina permanezca estable y no se desensamble. Sin embargo no se conoce sobre qué componentes de la ruta SIN actúa Clp1p/Flp1p para mantenerla activa e inducir la parada en G2 (Mishra et al., 2004).

4.4. Formación del septo

Como ya hemos visto, en *S. pombe* la contracción del anillo va acompañada de la deposición de material de membrana y pared celular, que van a formar un septo que divide a las dos células hijas.

El septo es una estructura multicapa compuesta por un septo primario en cuyos lados se sintetiza el septo secundario. Ambos están formados por 1,3- α -glucanos, 1,3- β -glucanos con ramificaciones en las posiciones 1,6 y galactomananos. Además el septo primario presenta una cadena lineal de 1,3- β -glucanos y el septo secundario contiene también 1,6- β -glucanos (Humbel et al., 2001).

Se conocen al menos 5 genes que codifican para la α -(1,3)-glucán sintasa: *mok1/ags1*, *mok11*, *mok12*, *mok13* y *mok14* (Hochstenbach et al., 1998; Katayama et al., 1999), y 4 para la subunidades catalíticas de la β -(1,3)-glucán sintasa: *bgs1*, *bgs2*, *bgs3* y *bgs4* (Cortes et al., 2005; Cortes et al., 2002; Liu et al., 2000a; Liu et al., 1999; Martin et al., 2003; Martin et al., 2000). De estos, sólo la proteína Drc1p/Cps1p/Bgs1p es esencial para la citocinesis (Liu et al., 1999). Bgs1p es la enzima encargada de la síntesis del septo primario (Cortes et al., 2007), mientras que Bgs4p se ha propuesto como la principal subunidad catalítica responsable de la síntesis del septo secundario (Cortes et al., 2005). Estas proteínas se localizan en los polos de la célula y se mueven a la zona central durante la septación, permaneciendo allí hasta la separación de las células hijas (Cortes et al., 2002). Esta localización, tanto en los polos como en la región media, depende del citoesqueleto de actina (Cortes et al., 2005; Cortes et al., 2002; Mulvihill et al., 2006).

Bgs1p no se ensambla en el sitio de división en mutantes SIN ni en un mutante *cdc15*, a pesar de que en estos mutantes el anillo de actinmiosina se ensambla perfectamente. Además, interacciones genéticas entre los mutantes *cps1-191* y *sid2-250*, sugieren que la ruta SIN puede tener algún papel directo o indirecto en el ensamblaje y/o activación de esta proteína. Puede que el anillo de actinmiosina sea la estructura donde la glucan sintasa se ensamble, mientras que el momento de este ensamblaje y la activación de la proteína sean dependientes de

la ruta SIN. La inactivación del SIN también es necesaria para que Bgs1p desaparezca del septo y se relocalice en los polos. Esto no ocurre con Bgs4p (Cortes et al., 2005; Cortes et al., 2002; Mulvihill et al., 2006).

La actividad de la β -(1,3)-glucán sintasa es regulada por la GTPasa Rho1p (Arellano et al., 1996). Esta proteína regula la biosíntesis de 1,3- β -D-glucanos de una manera dual, directamente y a través de Pck1p y Pck2p (Arellano et al., 1999; Calonge et al., 2000; Sayers et al., 2000). Por otro lado, otra GTPasa, Rho2p regula la biosíntesis de 1,3- α -D-glucanos a través de Pck2p (Arellano et al., 1999).

4.5. Separación de las células hijas

La separación de las células hijas una vez que el septo se ha ensamblado completamente requiere dos procesos de degradación (Alonso-Nunez et al., 2005): uno de ellos lo lleva a cabo la endo- β -(1,3)-glucanasa, Eng1p, que es la responsable de la degradación del septo primario (Martin-Cuadrado et al., 2003), y el segundo, la endo- α -(1,3)-glucanasa, Agn1p, que repara el “septum edging” (zonas ricas en α -glucanos que forman un cilindro de pared celular rodeando al septo) (Dekker et al., 2004; Garcia et al., 2005).

Las septinas (Snp1p, Snp2p, Snp3p y Snp4p) también juegan un papel importante en la separación celular. Aunque no son esenciales, su falta genera un fenotipo de células encadenadas que no se separan porque no son capaces de degradar el septo (An et al., 2004; Berlin et al., 2003; Longtine et al., 1998; Tasto et al., 2003). Se organizan como un anillo en el sitio de división, dependiente de Mid2p (An et al., 2004; Faty et al., 2002; Longtine and Bi, 2003) y parecen estar implicadas en la correcta localización de las glucanasas en el centro de la célula (Martin-Cuadrado et al., 2005).

Otras proteínas que también regulan de alguna u otra manera la separación celular son: el complejo del exocisto, que también participa en la localización de las glucanasas (Martin-Cuadrado et al., 2005); la GTPasa Rho4p que interviene en la secreción polarizada de estas proteínas (Santos et al., 2005); la ruta de las MAPK (MAP quinasas), cuyos mutantes poseen problemas en separación y septos

engrosados (Loewith et al., 2000; Sengar et al., 1997; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997)

Además, se ha descrito un modelo transcripcional de genes que son necesarios para la separación de las células (Petit et al., 2005). En este modelo se encuentran implicados los factores de transcripción Sep1p y Ace2p. Sep1p es un factor de transcripción que controla un grupo importante de genes entre los que se encuentra otro factor de transcripción, *ace2* (Peng et al., 2005; Rustici et al., 2004). A su vez Ace2p parece ser responsable de coordinar la separación de las células por regulación de las síntesis de las glucanasas y la formación del anillo de septinas (controlando la expresión de Mid2p). Las actividades combinadas de Sep1p y Ace2p aseguran que la salida de mitosis, citocinesis y separación de la célula, estén perfectamente coordinados (Petit et al., 2005).

5. GTPasas en *Schizosaccharomyces pombe*

Las GTPasas (GTP hidrolasas) son reguladores esenciales de prácticamente todos los procesos biológicos y por tanto, una regulación estricta de estas proteínas es necesaria para una función celular correcta. La importancia de las GTPasas y sus proteínas reguladores en la biología celular se pone de manifiesto por la implicación de estas proteínas en numerosas patologías humanas como son inmunodeficiencias hereditarias, replicación del VIH, retraso mental asociado al cromosoma X, alteraciones en el desarrollo y cáncer.

Las proteínas de la superfamilia Ras, también llamadas GTPasas pequeñas, forman un grupo independiente dentro de las GTP hidrolasas. Son proteínas monoméricas de pequeño tamaño, alrededor de 20-40 kDa, capaces de regular múltiples cascadas de señalización. Se pueden dividir en, al menos, cinco familias atendiendo a la similitud de su secuencia y su función:

- **Ras** (Ras sarcoma). Involucrada en regulación de la expresión génica, apoptosis, proliferación, diferenciación y morfología celular (Takai et al., 2001).
- **Rho** (Ras homologous). Participan en la reorganización de los filamentos de actina, regulación del ciclo celular y de la expresión génica (Etienne-Manneville and Hall, 2002).
- **Rab** (Ras-like proteins in brain). Controlan el transporte vesicular y el tráfico de proteínas entre distintos orgánulos (Zerial and McBride, 2001).
- **Arf** (ADP-ribosylation factor). Regulan el tráfico vesicular (Memon, 2004).
- **Ran** (Ras-like nuclear). Implicadas en el transporte nucleocitoplasmático de RNA y proteínas (Weis, 2003).

A estas GTPasas también se les conoce como interruptores moleculares ya que oscilan entre dos estados, activo e inactivo, en función de si están unidas a GTP o a GDP respectivamente (Vetter and Wittinghofer, 2001). El paso de un estado a otro se produce de manera muy lenta, por lo que necesita ser catalizado por otras proteínas (Figura I.9). Existen tres grupos de proteínas que controlan el estado de activación de las GTPasas:

- Los **GEFs** (guanosine exchange factors), que favorecen el intercambio de GDP por GTP, activando a la GTPasa.
- Los **GAPs** (GTPase activating proteins), que estimulan su actividad hidrolasa intrínseca, provocando su inactivación.
- Y los **GDIs** (guanosine dissociation inhibitors), que sólo regulan a las GTPasas de las familias Rho y Rab, manteniendo a las GTPasas en su estado inactivo, impidiendo su activación por los GEFs. Los GDIs también participan en la liberación de las GTPasas de la membrana ocultando su grupo isoprenilo. De esta forma secuestran a la GTPasa en su estado inactivo en el citosol e impiden su activación. (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Olofsson, 1999)

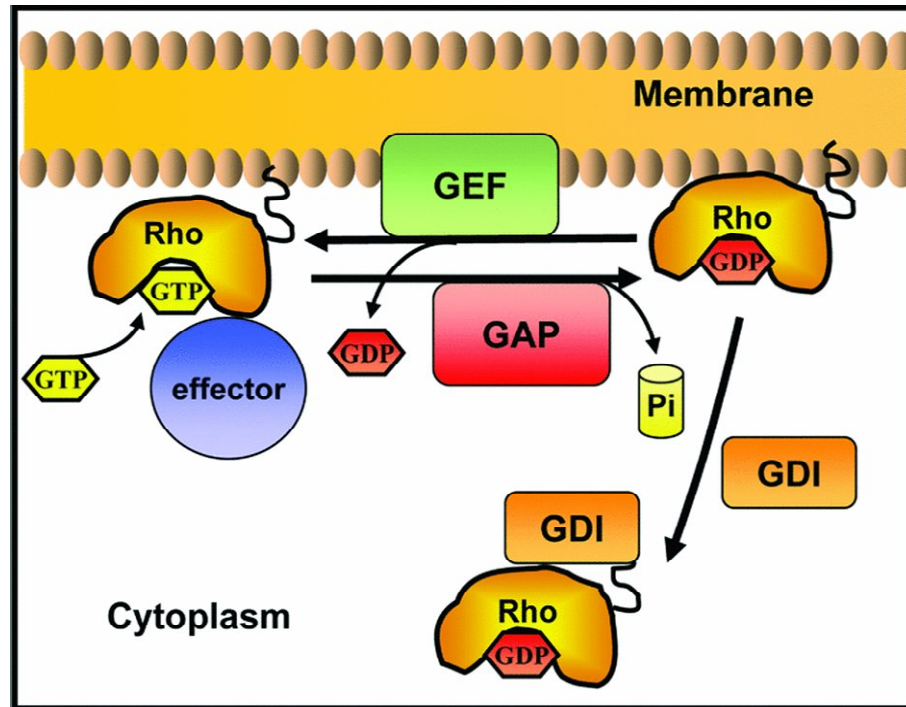


Figura I.9: Esquema de la regulación de las GTPasas. Se usa como ejemplo la regulación de la GTPasa tipo Rho, por poseer los tres tipos de reguladores. Los GDIs sólo regulan a las GTPasas de las familias Rho y Rab, mientras que los GAPs y los GEFs están presentes en la regulación de todas las subfamilias (Perez and Rincon., 2010).

En general existen más GEFs y GAPs que proteínas G a las que regulan, de hecho una misma GTPasa puede ser regulada por varios GEFs y GAPs, lo que permite una gran especificidad en el control de las diferentes rutas de señalización en las que participan. Además, GEFs y GAPs son proteínas complejas, con múltiples dominios capaces de interaccionar con otras proteínas o con lípidos, lo que indica que podrían actuar como señales de localización o como adaptadores para la formación de complejos multiproteicos (Bos et al., 2007; Moon and Zheng, 2003; Rossman et al., 2005; Schmidt and Hall, 2002).

5.1. Spg1p, una GTPasa de la familia Ras esencial para la formación del septo en *S. pombe*

La GTPasa Spg1p (septum promoting GTPase) fue aislada en una búsqueda de supresores de la proteína quinasa Cdc7p (Schmidt et al., 1997). Un análisis más detallado reveló la presencia de cuatro intrones que codificaban para una proteína de 198 aminoácidos. Esta proteína pertenece a la superfamilia de las Ras GTPasas y posee un 57% de homología con la proteína Tem1p de *S. cerevisiae* y un 17% con la proteína humana N-Ras, aunque la complementación con Tem1p no es posible.

Ni Spg1p ni Tem1p pertenecen a ninguna de las subfamilias conocidas de proteínas G, aunque muestran algunas similitudes en secuencia con las proteínas de la subfamilia Rab. A pesar de esto se sabe que no pertenecen tampoco a esta subfamilia ya que carecen de secuencias importantes como por ejemplo el dominio C-terminal de prenilación para unión a membrana (CAAX). Los residuos 38-47 de esta GTPasa sí muestran gran similitud con el dominio de interacción con los GAPs de la familia Rab (Bourne et al., 1991).

Spg1p es un gen esencial que a diferencia de Tem1p, no está implicado en la salida de mitosis sino en la formación del septo y se requiere para la correcta localización de Cdc7p al SPB, pero no para regular su actividad quinasa (Mehta and Gould, 2006; Sohrmann et al., 1998).

La actividad de Spg1p está regulada negativamente por un GAP, Cdc16p (Fankhauser and Simanis, 1993), que requiere la unión a otra proteína, Byr4p (Furge et al., 1998; Song et al., 1996), para realizar su función. Respecto a la activación de esta proteína, no se ha identificado ningún GEF que pueda activarla. Sin embargo, el análisis de la localización de los GAPs durante mitosis (Cerutti and Simanis, 1999; Li et al., 2000) es consistente con un modelo en el que la regulación de la actividad GAP junto con la capacidad intrínseca de esta proteína para realizar el intercambio GDP por GTP, es suficiente para modular la actividad de Spg1p sin el requerimiento de un GEF (Simanis, 2003). Recientemente se ha descrito que la proteína Etd1p es un activador de Spg1p, aunque no se ha demostrado actividad GEF (Garcia-Cortes and McCollum, 2009).

5.2. Rho1p, una GTPasa de la familia Rho. Funciones y reguladores.

Las GTPasas Rho (Ras Homology) constituyen una familia dentro de la superfamilia de pequeñas GTPasas Ras y se encuentran en todas las células eucariotas. La familia de GTPasas Rho incluye tres subfamilias: Rho, Rac y Cdc42 (Arellano et al., 1999; Heasman and Ridley, 2008; Iden and Collard, 2008; Jaffe and Hall, 2005; Park and Bi, 2007).

Las proteínas Rho comparten con los demás miembros de la superfamilia Ras un diseño estructural y un mecanismo molecular por el cual, se activan cuando se unen a GTP y se inactivan cuando este compuesto es hidrolizado a GDP. En su estado unido a GTP estas GTPasas se unen a una gran cantidad de moléculas efectoras, que permiten la activación de las cascadas de señalización, que a su vez promueven respuestas celulares generales, como cambios del citoesqueleto, dinámica de microtúbulos, tráfico de vesículas, polaridad celular y progresión del ciclo celular. La plasticidad de las proteínas Rho en cuanto a localización subcelular, regulación, unión a los efectores y relación con proteínas de otras rutas celulares, sitúan a estas GTPasas en un punto central de la regulación de una gran cantidad de procesos celulares (Bustelo et al., 2007; Garcia et al., 2006b; Heasman and Ridley, 2008; Iden and Collard, 2008; Park and Bi, 2007).

Las proteínas Rho interactúan con sus efectores moleculares para aumentar la señal específica de las cascadas de transducción de señales. Estas interacciones se pueden englobar en los tres modelos siguientes:

- La interacción de la GTPasa con su efector provoca un cambio de conformación que activa a la proteína y/o la localiza (Bishop and Hall, 2000; Jaffe and Hall, 2005).
- Otras veces, la GTPasa estimula la liberación de factores inhibitorios a los que estaban asociados los efectores.
- En otras ocasiones la GTPasa produce la inhibición y no la activación, de la proteína efectora.

Cabe destacar que entre las funciones de los efectores muchas veces se encuentra la de regular a las propias GTPasas, lo que contribuye a una señalización por GTPasas coordinada y equilibrada. Esto pone de manifiesto el alto nivel de plasticidad que tienen lugar en las rutas de transducción de señales de GTPasas (Bustelo et al., 2007; Park and Bi, 2007).

Respecto a la regulación de estas GTPasas, podemos distinguir varios mecanismos:

- **Regulación por cambio de nucleótido (GTP/GDP)** como se da en todas las GTPasas de la superfamilia Ras. Los GEFs (Guanine Exchange Factor) facilitan el cambio de GDP por GTP, activando a las GTPasas. Las proteínas GAPs (GTPase Activating Protein) producen la hidrólisis del GTP, permitiendo a la GTPasa volver a su estado inactivo. Y los GDIs (guanosine dissociation inhibitors) mantienen a las GTPasas en su estado inactivo.
- **Regulación por cambios en su localización subcelular.** Muchas proteínas Rho deben anclarse a la membrana para poder realizar sus funciones biológicas y la condición esencial para ello es la incorporación de un grupo de naturaleza isoprenoide en el extremo C-Terminal, denominado “Caja CAAX”. Las proteínas GDIs juegan un papel importante en la regulación del anclaje a la membrana de estas proteínas, ya que secuestran a la GTPasa inactiva en el citosol. Además, la función de los GDIs también es importante para la liberación de estas proteínas de la membrana cuando termina el proceso de señalización.
- **Regulación por degradación** en lugares específicos de las células.
- **Regulación por autoinhibición.** Ciertas proteínas Rho presentan un dominio de autoinhibición en su extremo N-terminal. Dicha autoinhibición puede ser desactivada mediante la unión de una proteína adaptadora.
- **Regulación por fosforilación.** Las GTPasas también pueden estar fosforiladas en residuos específicos, esta modificación postranscripcional puede influir en su interacción con los GDIs, su estabilidad en la membrana y sus funciones efectoras (Bustelo et al., 2007).

En *S. pombe* existen 6 miembros de esta familia de GTPasas: Rho1-5p y Cdc42p, de los cuales sólo dos, Rho1p y Cdc42p son esenciales para la supervivencia de la célula (Arellano et al., 1996; Miller and Johnson, 1994; Nakano et al., 1997).

La GTPasa Rho1p es la principal GTPasa que interviene en la biosíntesis de la pared celular y por ello es esencial. Esta GTPasa presenta un 73% y un 67% de identidad frente a Rho1p de *S. cerevisiae* y RhoA de células humanas respectivamente (Nakano and Mabuchi, 1995). En *S. pombe* Rho1p presenta funciones relacionadas con la biosíntesis de la pared celular y con la polarización de actina. Rho1p activa directamente a la $\beta(1,3)$ -glucán sintasa (Arellano et al., 1996). Otras dos proteínas efectoras sobre las que actúa Rho1p son las quinasas Pck1p y Pck2p. Ambas proteínas intervienen en el mantenimiento de la integridad celular. Rho1p activa la biosíntesis de pared celular directamente a través de la $\beta(1,3)$ -glucán sintasa e indirectamente a través de Pck1p y Pck2p.

En células de mamífero, RhoA interviene en la formación del anillo contráctil de actinomiosina, liberando a las forminas de su estado de autoinhibición. RhoA activa también a la quinasa ROCK que a su vez activa las miosinas responsables del ensamblaje y contracción del anillo (Glotzer, 2005). En *S. pombe* no se ha descrito ninguna interacción de Rho1p con las forminas.

Rho1p se localiza en los lugares de crecimiento celular, polos y septo, donde activa la síntesis de pared (Arellano et al., 1997; Nakano et al., 1997). Respecto a su regulación, hasta ahora se han identificado tres GEFs, Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, tres GAPs, Rga1p, Rga5p y Rga8p y una proteína GDI, Rdi1p (Calonge et al., 2003; Nakano et al., 2003; Nakano et al., 2001; Yang et al., 2003).

- **Rgf1p** regula la biosíntesis de la pared celular, es necesaria para la activación del crecimiento en el polo nuevo durante NETO y participa en la activación de la ruta de MAPK, Mkh1p-Pek1p-Pmk1p (Garcia et al., 2006a; Garcia et al., 2009b).
- **Rgf2p** es esencial durante el proceso de esporulación y podría cooperar con Rgf1p en la biosíntesis de pared durante el crecimiento vegetativo (Garcia et al., 2009a).

- **Rgf3p** activa a Rho1p específicamente durante la citocinesis (Morrell-Falvey et al., 2005; Mutoh et al., 2005; Tajadura et al., 2004).
- **Rga1p** es el principal regulador negativo de Rho1p. Su eliminación ralentiza el crecimiento y provoca alteraciones morfológicas similares a las producidas por la sobreexpresión de Rho1p (Nakano et al., 2001).
- **Rga5p** participa en la regulación de la actividad β -glucán sintasa y en el mantenimiento de la integridad celular (Calonge et al., 2003).
- **Rga8p** se aisló a partir de una búsqueda de proteínas que interaccionaban con Pak1p/Shk1p, quinasa efectora de Cdc42p, pero su función apenas se conoce (Yang et al., 2003).

6. Las proteínas fosfatasas 2A y su función en la regulación de la citocinesis

Los procesos de fosforilación-desfosforilación de las proteínas juegan un papel esencial en muchos procesos celulares como la expresión génica, la proliferación y la diferenciación celular o la respuesta a estímulos. Por esto, la acción coordinada de las fosfatasas y las quinasas es fundamental para regular la actividad de muchas proteínas. De hecho, una desregulación en estos procesos puede inducir incluso la formación de tumores.

Las proteínas fosfatasas de tipo 2A (PP2A) pertenecen a una familia de fosfatasas de serina treonina que se encuentran muy conservadas desde levaduras a humanos y cuya actividad está altamente regulada. Estas fosfatasas son complejos heterotriméricos formados por una subunidad catalítica de 37KDa (PP2AC), una subunidad estructural de peso molecular 65kDa, denominada subunidad A y una tercera subunidad reguladora B que se une a este dímero. Hasta el momento se han descrito cuatro familias de estas subunidades reguladoras que se denominan subunidad B, B', B'', B'''. Sólo una de estas subunidades puede asociarse con el núcleo dimérico PP2AD (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994). Parece que es esta subunidad B la que le da al complejo la especificidad de sustrato.

En *S. pombe* esta proteína está codificada por diferentes genes (Figura I.10)

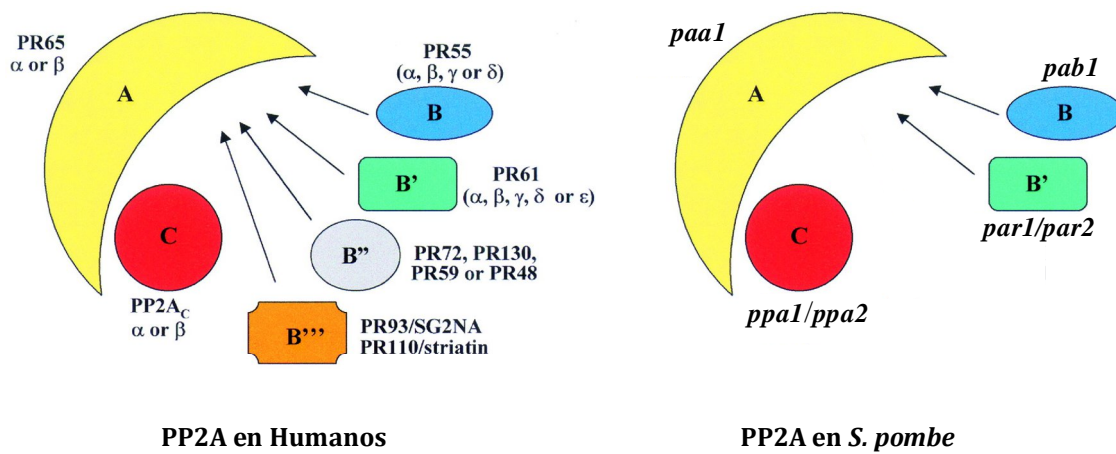


Figura I.10: Estructura de los complejos de las proteínas fosfatasa de tipo 2A en células humanas y en *S.pombe*. C es la subunidad catalítica del complejo, A es la subunidad estructural y B son las distintas subunidades reguladoras. Modificada de (Janssens and Goris, 2001).

- **Subunidad catalítica:** existen 2 subunidades codificadas por *ppa1* y *ppa2*. La delección de las dos subunidades es letal y causa un fenotipo de entrada en mitosis prematura, posiblemente por que puedan estar regulando de forma positiva la fosfatasa Cdc25p y/o de forma negativa a Wee1p (Kinoshita et al., 1990; Kinoshita et al., 1993).
- **Subunidad estructural:** codificada por *paa1*
- **Subunidad reguladora:** en *S. pombe* sólo se han descrito la B y la B'.
 - La subunidad B' está codificada por los genes *par1* y *par2*. El doble mutante es viable pero sensible a temperaturas extremas y estrés. Estas proteínas están implicadas en la morfología de la célula y la formación del septo (Jiang and Hallberg, 2000; Jiang and Hallberg, 2001; Le Goff et al., 2001). Se sabe que Par1p es un inhibidor de la ruta SIN que desfosforila a Cdc11p a final de mitosis (Krapp et al., 2003). Además, la delección de *par1* rescata los defectos de crecimiento de los mutantes en *spg1*, *cdc7* y *cdc11* (Le Goff et al., 2001) y en *sid2* (Jin et al., 2006),

sugiriendo que PP2A-par1p actúa como un regulador negativo de estas proteínas. Existen también interacciones negativas entre esta proteína y el complejo Sid2p-Mob1p, lo que sugiere que es posible que PP2A-Par1p esté actuando en diferentes puntos de la ruta SIN ejerciendo una regulación tanto negativa como positiva (Figura I.11)

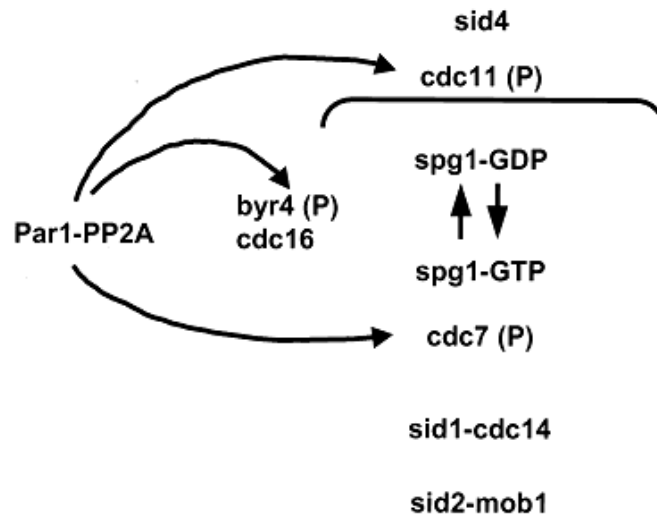


Figura I.11: Posibles niveles de actuación de Par1p. El rescate de los mutantes en *spg1*, *cdc7* y *cdc11*, hace pensar que Par1p pueda estar actuando sobre alguna de estas proteínas (Le Goff et al., 2001)

- Existe un único gen que codifica para la subunidad reguladora B, *pab1*. Esta proteína interacciona físicamente con la subunidad catalítica Ppa2p y se ha descrito que podría estar implicada en regular la morfología de la célula, la síntesis de pared y la citocinesis (Kinoshita et al., 1996; Lahoz et al., 2010; Le Goff et al., 2001). A diferencia de *par1*, un mutante *pab1* es capaz de suprimir, además de defectos en mutantes *cdc11*, los defectos de crecimiento de los mutantes SIN⁻, *etd1-1*, *mob1-R4* y *sid1-239* (Lahoz et al., 2010), indicando esto que diferentes subunidades de PP2A podrían estar regulando la ruta SIN a diferentes niveles.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Con el fin de buscar nuevos mutantes de división celular en *S. pombe*, en nuestro laboratorio se usó el etanol como sistema condicional. De esta búsqueda se seleccionaron mutantes que eran dependientes de etanol para vivir, a los que se denominó **mutantes *etd***- (Jimenez and Oballe, 1994). Uno de estos mutantes, *etd1-1*, crece a cualquier temperatura en presencia de etanol (6% v/v), pero en ausencia de este alcohol no es capaz de crecer a ninguna temperatura entre 25°C y 35°C. El mutante *etd1-1* en estas condiciones restrictivas divide los núcleos pero no contrae el anillo de actinmiosina, impidiendo por tanto la formación del septo y la separación en dos células hijas. De esta manera, se forman células alargadas y polinucleadas, un fenotipo característico de los mutantes de citocinesis y septación (Figura A.1).

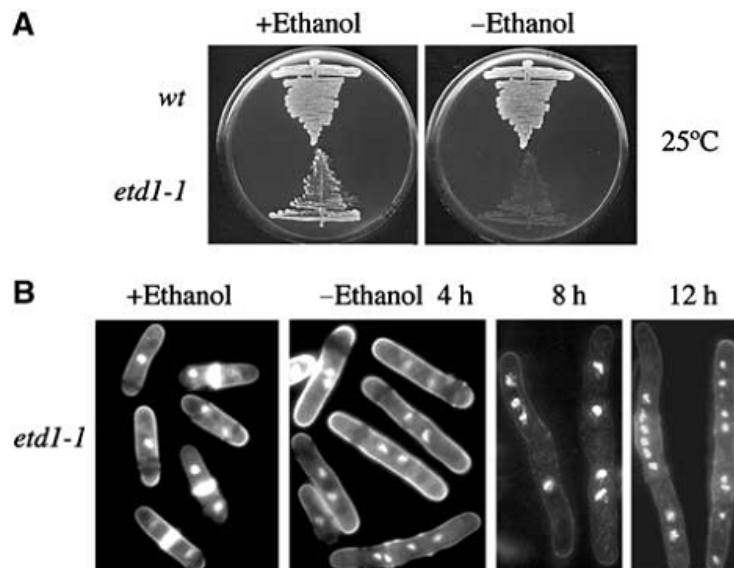


Figura A.1. *etd1* es un gen esencial requerido para la citocinesis A) Crecimiento del mutante *etd1-1* y un silvestre (*wt*) a 25°C en YES suplementado con 6% de etanol y en YES sin etanol. B) Microscopía de DAPI-Calcoflúor del silvestre y el mutante en YES con 6% de etanol y *etd1-1* en condiciones restrictivas sin etanol. (Daga et al., 2005)

Además de este fenotipo relativo a la citocinesis y a la septación, se observó que este mutante presentaba serios defectos en la integridad de la pared celular sufriendo un proceso de lisis (Figura A.2).

La delección de *etd1* presenta el mismo fenotipo que el mutante a temperatura restrictiva. Por lo tanto, Etd1p es una proteína esencial para la citocinesis de *S. pombe* a temperaturas fisiológicas inferiores a 36°C. En condiciones de estrés térmico, de 36-37°C, tanto *etd1-1* como el mutante *etd1Δ* pueden crecer.

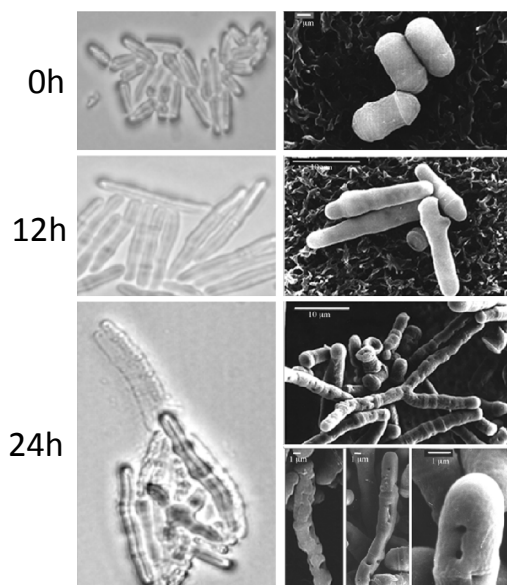


Figura A.2. Etd1p se requiere para mantener la integridad de la pared celular. Microscopía óptica (izquierda) y microscopía electrónica de barrido (derecha) del mutante *etd1-1* crecido a 37°C (temperatura permisiva) después de 0, 12 y 18 horas de incubación a 25°C (temperatura restrictiva).

Etd1p se localiza en el citoplasma y principalmente asociado a la membrana de la célula, relocalizándose desde las puntas de crecimiento, en interfase, al sitio de septación durante la citocinesis (Figura A.3). Pero en mutantes defectivos en SIN o en el ensamblaje del anillo, Etd1p se mantiene como una banda ancha en el centro de la célula y no es capaz de ensamblarse en el anillo, indicando que el reclutamiento de Etd1p al anillo requiere de los componentes de éste y de la actividad de SIN. A su vez, el complejo Sid2p-Mob1p (únicas proteínas de SIN que se localizan en el anillo) requiere la presencia de Etd1p para pasar de los SPBs al anillo (Daga et al., 2005).

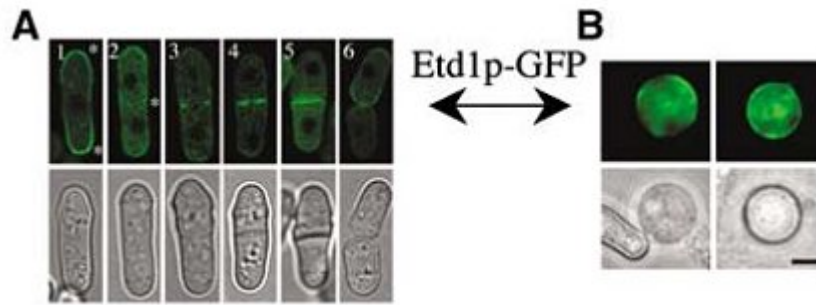


Figura A.3. Etd1p localiza en el sitio de división al final de mitosis. A) Localización de EGFP-Etd1p a lo largo del ciclo. B) Localización de EGFP-Etd1p en protoplastos. Etd1p se asocia a la membrana plasmática (Daga et al., 2005).

Tanto en la delección de *etd1* como en el mutante *etd1-1*, el anillo de actinmiosina es capaz de formarse pero no se inicia ni la contracción ni la síntesis del septo. A su vez Etd1p necesita de la ruta SIN y los componentes del anillo para su correcta localización (Daga et al., 2005). Por todo esto, Etd1p parecía ser un buen candidato para establecer una comunicación entre el anillo de actinmiosina y la maquinaria de septación, permitiendo de esa forma que la citocinesis tenga lugar de manera coordinada con la mitosis. Los datos indican también que *etd1* es esencial para mantener la ruta SIN activa durante el proceso de septación (Daga et al., 2005; Krapp and Simanis, 2005). Trabajos posteriores han demostrado que Etd1p también actúa aguas arriba de la ruta activando a la GTPasa principal, Spg1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). El hecho de que Etd1p responda a la ruta SIN, a la vez que la ruta SIN necesite de Etd1p para su actividad, hacen pensar que esta proteína actúa en un bucle de retroalimentación, aunque éste es un aspecto que está aún pendiente de caracterizar (Lattmann et al., 2009).

Por otro lado, también se observó que la letalidad del mutante *etd1* se suprimía espontáneamente por numerosos mutantes extragénicos (Jimenez and Oballe, 1994). Uno de estos supresores, *pab1-4*, codifica para una subunidad reguladora B de la fosfatasa PP2A, Pab1p (Lahoz et al., 2010). Este mutante *pab1-4* suprime los defectos de citocinesis y crecimiento, no sólo del mutante *etd1* (Figura A.4), sino también de otros mutantes de la ruta SIN, indicando esto que Pab1p puede estar actuando como un inhibidor de la ruta SIN. Las células que carecen de Pab1p presentan un fenotipo redondeado con problemas en polaridad, una

observación que permitió establecer por primera vez un mecanismo de coordinación entre la ruta de septación y la ruta de morfogénesis en *S. pombe* (Jimenez and Oballe, 1994), y de la misma forma, establece para esta fosfatasa un papel antagónico a Etd1p en la regulación de la citocinesis (Lahoz et al., 2010).

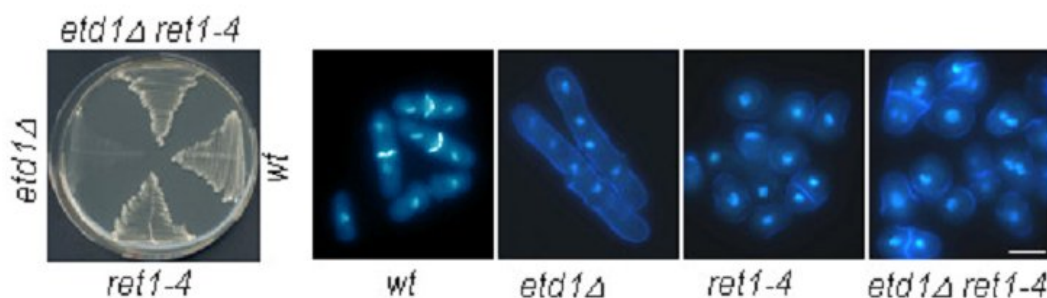


Figura A.4. Identificación de un supresor del mutante *etd1*, *pab1*. Crecimiento a 25°C de un silvestre (*wt*), y de los mutantes *ret1-4*, *etd1Δ* (*etd1::ura4*) y *etd1Δret1-4*. Estos resultados muestran que *ret1-4* es capaz de suprimir los defectos de crecimiento y septación del mutante *etd1*, como se observa en las tinciones con DAPI-Calcofluor (Lahoz et al., 2010).

Los principales objetivos de este proyecto derivan de este trabajo de caracterización de mutantes que carecen de la proteína Etd1p y sus supresores, realizado en nuestro laboratorio, que ha generado una línea de trabajo encaminada a descifrar los mecanismos moleculares que coordinan la división, la citocinesis y la septación, a través de la proteína Etd1p en la levadura de fisión *Schizosaccharomyce pombe*. Para ello nos planteamos:

- Identificar proteínas dianas de Etd1p y sus supresores.
- Caracterizar la proteína Etd1p mediante la identificación de dominios de localización y función.
- Estudiar el papel de la proteína Etd1p y otros reguladores en la citocinesis y la ruta de inicio de septación (SIN) de *S. pombe*.
- Analizar el papel de Etd1p y otros reguladores en la asimetría de la ruta SIN.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

**Papel antagónico de Etd1p y
PP2A-Pab1p en el control de la
citocinesis.**

1.1. La falta de actividad Pab1p suprime los defectos de crecimiento y septación del mutante *etd1*

La proteína Etd1p juega un papel esencial en *S. pombe*, pero su actividad bioquímica está aún por descifrar. El estudio de sus supresores puede ayudar a identificar su función molecular, y eventualmente su actividad, por lo que en este proyecto se decidió analizar en más profundidad uno de estos supresores, *pab1-4*, que había sido identificado previamente como un alelo específico de la subunidad B de la fosfatasa PP2A. Para determinar si la supresión de los defectos de crecimiento y citocinesis del mutante *etd1* por *pab1-4* correspondía a la falta de función del gen, se construyó una cepa delecionada para *pab1*.

La deleción se realizó reemplazando por recombinación homóloga el gen *pab1* por el gen de resistencia a la kanamicina en una cepa silvestre, usando el sistema de (Bahler et al., 1998b).

Se observó que la deleción de *pab1* es viable y presenta el mismo fenotipo que el alelo *pab1-4* (Figura 1.1)

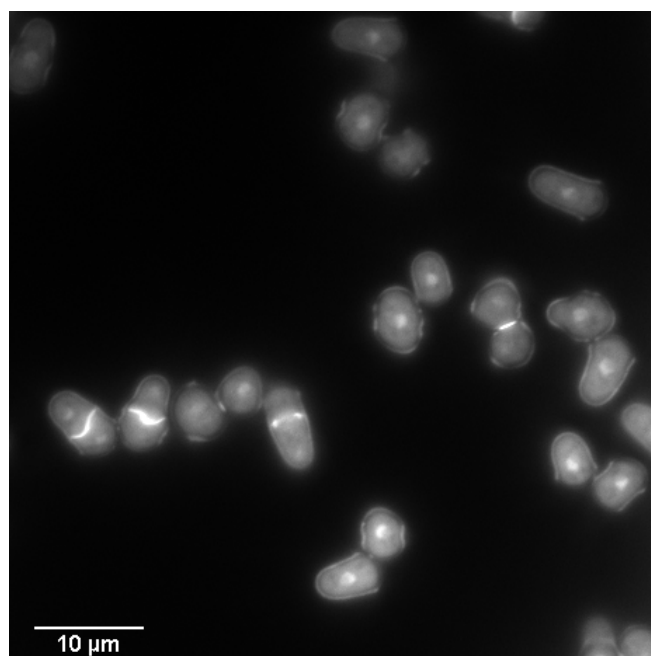


Figura 1.1. La deleción de *pab1* presenta el mismo fenotipo que el mutante *pab1-4*. DAPI-Calcoflúor del mutante *pab1Δ*.

El doble mutante *etd1Δ::ura4 pab1Δ::KanR* se construyó cruzando los mutantes simples por separado y seleccionando colonias que fueran *ura+* y Kanamicina resistentes a 37°C. Mediante la realización de un ensayo de gota a 25°C se comprobó que la delección de *pab1* también es capaz de rescatar la falta de crecimiento y los defectos en citocinesis de la delección de *etd1*. Pero además de este fenotipo de supresión de los defectos de crecimiento y citocinesis de los mutantes *etd1*, la falta de actividad de Pab1p también presenta una pérdida de polaridad, siendo las células redondeadas o con forma de pera. La supresión de los defectos de la falta de *etd1* podría no ser por tanto, algo específico de esta subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A, sino deberse a un efecto indirecto de la falta de polaridad. Para comprobarlo, se analizó si otros mutantes afectados en polaridad y morfogénesis podían también suprimir al mutante *etd1Δ*. Para ello empleamos el mutante de delección del gen *scd1*, que codifica para un GEF de la proteína Cdc42p (Das et al., 2009), y cuyo fenotipo es redondeado al igual que el de *pab1Δ*. Mediante un ensayo de gota se comprobó que el doble mutante *etd1Δ scd1Δ* no es capaz de rescatar la letalidad del mutante *etd1Δ* (Figura 1.6). Por lo tanto se concluyó que la supresión de los mutantes *etd1Δ* por *pab1Δ* es específica de la falta de función de esta subunidad de la fosfatasa y no indirectamente causada por la pérdida de polaridad. (Figura 1.2)

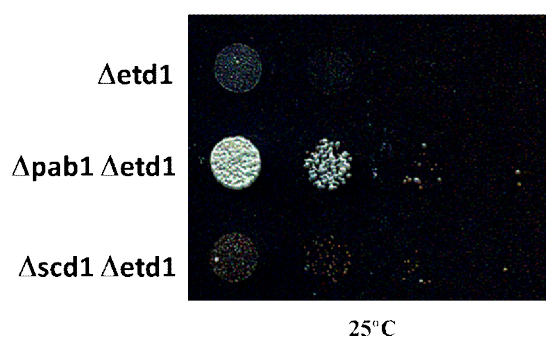


Figura 1.2. La delección de *pab1* suprime los defectos de crecimiento del mutante *etd1* debido a su falta de función. Ensayo de gota realizado a 25°C de los mutantes *etd1Δ*, *etd1Δpab1Δ* y *etd1Δscd1Δ*

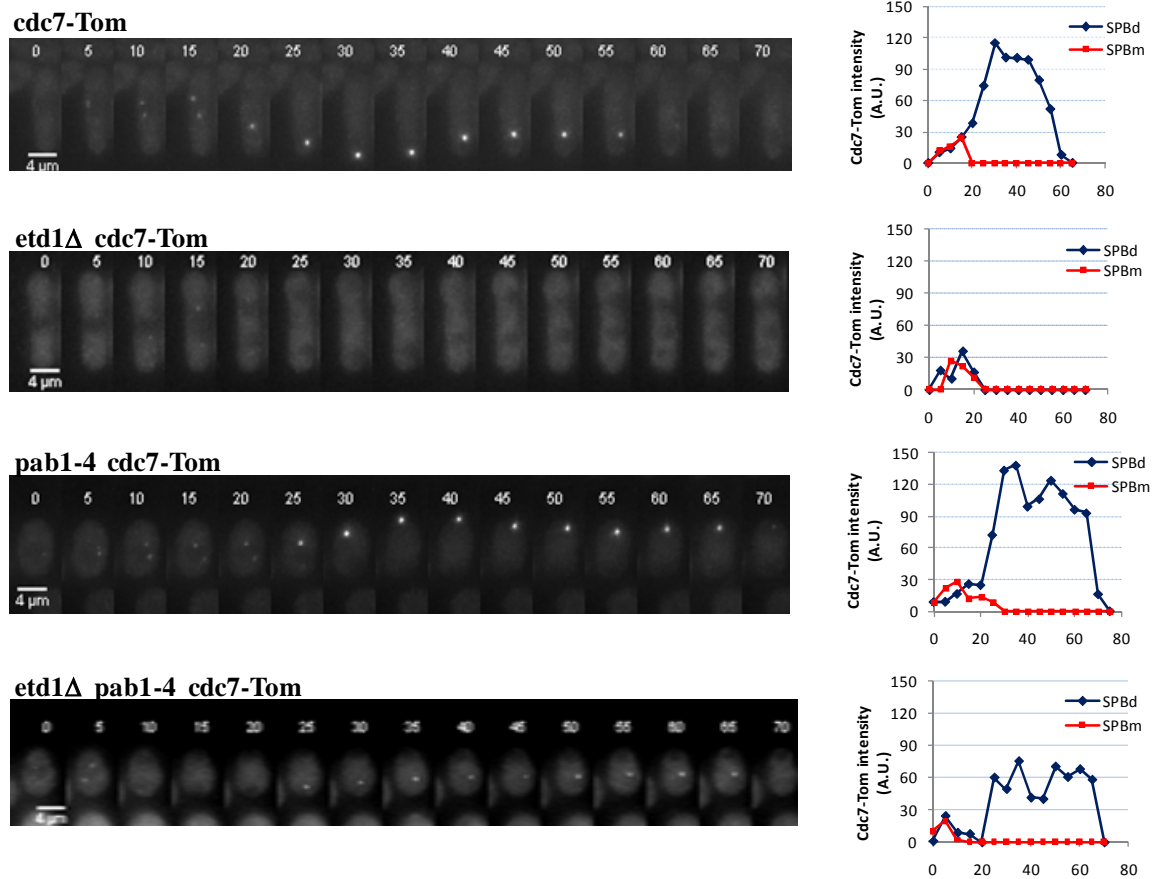
1.2. El complejo PP2A-Pab1p regula negativamente a Spg1p

Como ya se ha mencionado, Etd1p es un componente esencial de la ruta SIN (Daga et al., 2005) y funciona como un regulador positivo de Spg1p pudiendo ser un homólogo funcional de la proteína de *S. cerevisiae*, Lte1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). La actividad de Spg1p y, consecuentemente, la actividad de la ruta SIN, se puede determinar indirectamente observando al microscopio la unión de Cdc7p al SPB, ya que Cdc7p solamente se une a la forma activa de Spg1p (Spg1p-GTP) (Sohrmann et al., 1998). Por lo tanto, para determinar el mecanismo por el cual el mutante *pab1* suprime las deficiencias de *etd1Δ* en citocinesis y septación, se analizó la localización de Cdc7p-Tomato en los mutantes *etd1Δ*, *pab1-4* y *etd1Δ pab1-4* mediante microscopía.

Como se observa en la Figura 1.3, en una cepa silvestre Cdc7p localiza en los dos SPBs al principio de la mitosis y durante anafase B la señal se mantiene únicamente en uno de los SPBs. En el mutante *pab1-4* se observaron resultados similares. Etd1p se requiere para mantener la actividad de Spg1p durante el final de anafase (Daga et al., 2005; Garcia-Cortes and McCollum, 2009), por lo que, consecuentemente, se observó que en el mutante *etd1Δ* la señal de Cdc7p desaparece prematuramente en los dos SPBs o permanece extremadamente débil en uno de ellos, indicando que la actividad de Spg1p no se mantiene en este mutante. Lo interesante es que en el doble mutante *pab1-4 etd1Δ* se restaura la actividad de Spg1p en uno de los SPBs durante anafase B, pudiendose mantener la asimetría de Cdc7p, a pesar de la dependencia que tiene esta GTPasa de Etd1p para su activación. Por lo tanto, podríamos pensar que PP2A, a través de su subunidad reguladora Pab1p, estaría funcionando como un regulador negativo de Spg1p, antagónico a Etd1p.

De esta forma, si el complejo PP2A-Pab1p inhibe a Spg1p, la mutación *pab1-4* estaría contrarrestando los defectos de citocinesis y crecimiento de la falta de Etd1p, restaurando la ruta SIN a nivel de Spg1p.

A



B

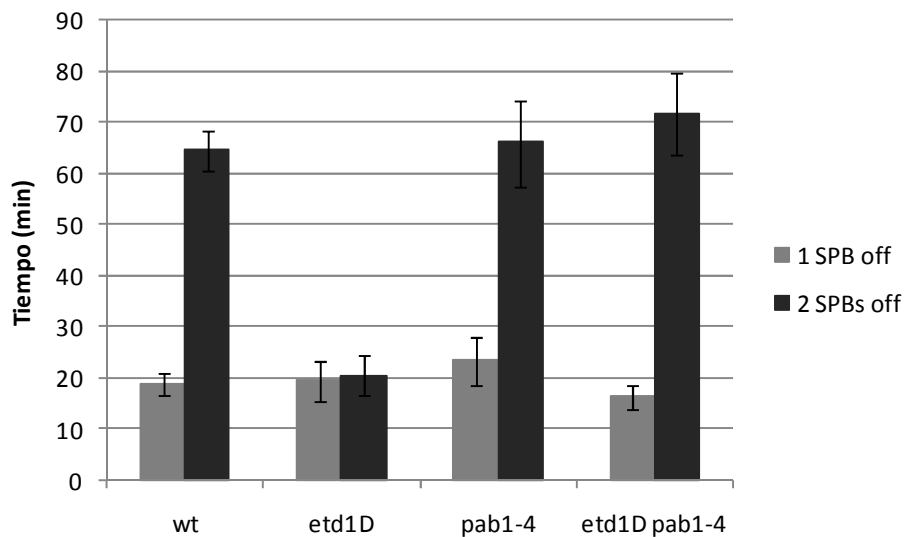


Figura 1.3. Efectos de *pab1-4* en la actividad de Spg1p . A) Proyección máxima (14 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc7-Tom a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada (unidades arbitrarias) y representada para cada SPB (SPBd: daughter and SPBm: mother). **B)** Media del tiempo que los SPBs permanecen activos (n=15).

1.3. Activación de la septación independiente de SIN por *pab1-4*

La activación de la ruta SIN requiere la transducción de la señal iniciada por Spg1p hasta el sitio de división, a través de una cascada de proteínas quinasas. Una vez comprobado que la pérdida de actividad de Pab1p activa Spg1p en ausencia de Etd1p, quisimos comprobar que esta activación recupera íntegramente toda la cascada de señalización SIN. Para ello se analizó mediante microscopía la localización de la quinasa Sid2p-Mob1p, un complejo que actúa al final de la ruta y transmite la señal SIN del SPB al anillo de actinmiosina para iniciar la citocinesis.

Sid2p-GFP es sintético letal con la delección de *etd1* (Daga et al., 2005), por lo que usamos Mob1p-GFP para seguir *in vivo* la localización de este complejo. Como muestra la Figura 1.4, en una cepa silvestre, Mob1p-GFP localiza en los 2 SPBs y durante septación aparece también en el sitio de división (Hou et al., 2004; Salimova et al., 2000). En el mutante *pab1-4* esta localización se mantiene y como previamente se había descrito si no hay Etd1p en la célula Mob1p nunca aparece en el anillo. En el doble mutante *etd1Δ pab1-4*, en el que las células ahora son capaces de dividirse y septar y se restaura la actividad de Spg1p, se observó, sorprendentemente, que Mob1p-GFP tampoco aparece en el anillo o lo hace muy débilmente. La cuantificación de la intensidad de Mob1p-GFP en el sitio de división con respecto a la de los SPBs confirma este resultado (Figura 1.4 B)

Para estar seguros de que en esta cepa la división estaba ocurriendo con normalidad, usamos un marcador de anillo (Rlc1p-Tomato) para poder seguir la progresión de la citocinesis. Efectivamente el anillo de actomiosina se forma y se contrae sin ningún problema a pesar de que Sid2p-Mob1p no se localice en el sitio de división (Figura 1.4 C). Por tanto, aunque *pab1-4* sea capaz de activar Spg1p en ausencia de Etd1p, la señal de la ruta SIN no se transmite correctamente al sitio de división en esta cepa.

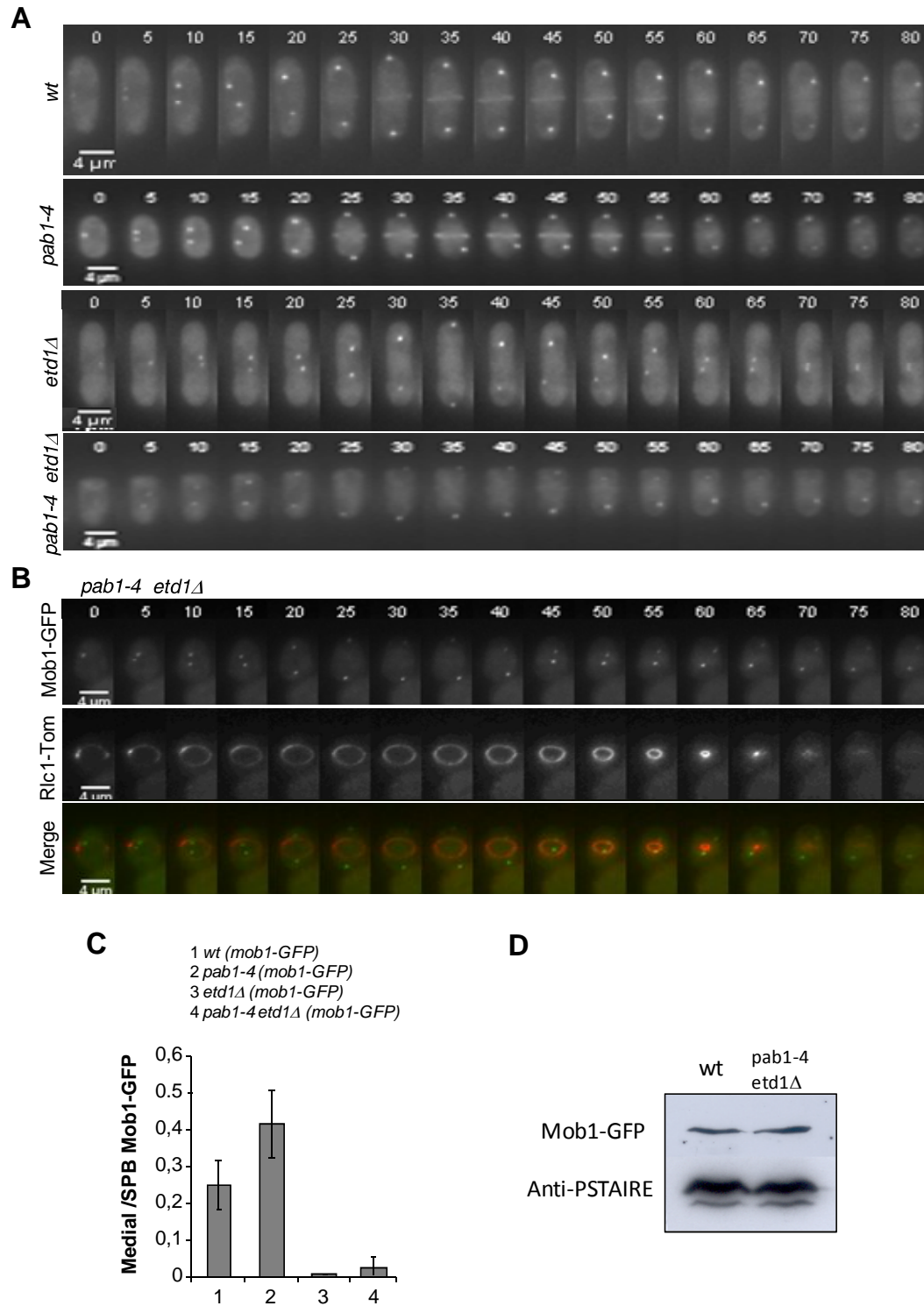


Figura 1.4. *pab1-4* activa la septación de manera independiente a SIN. A) Proyección máxima (14 planos de 0,5 μ M) de la localización de Mob1p-GFP a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. B) Proyección máxima de la localización de Mob1p-GFP y Rlc1p-Tomato. C) Intensidad relativa de la fluorescencia de Mob1p-GFP en el anillo respecto a la de los SPBs (1: *wt*; 2: *pab1-4*; 3: *etd1Δ*; 4: *etd1Δ pab1-4*). D) Medida de la cantidad de Mob1p-GFP en el mutante *ret1-4 etd1Δ* comparándola con la cantidad en un silvestre, mediante western blot. Los cultivos se crecieron a 25°C y se recogieron las células en RIPA (Buffer desnaturizante). El western blot se reveló usando un anticuerpo anti-GFP y para el control de carga se usó el anticuerpo anti-PSTAIRE.

La disminución de intensidad de Mob1p-GFP en el sitio de división en la cepa *etd1Δ pab1-4* podría deberse a una disminución de la cantidad de proteína en estas células. Para comprobar esta posibilidad, se analizó mediante western-blot la cantidad de Mob1p-GFP en un fondo *etd1Δ pab1-4* y en un fondo silvestre. En la Figura 1.4 D se puede observar que la cantidad total de Mob1p-GFP se mantiene constante en ambas cepas, con lo cual, podemos concluir que Etd1p es esencial para la localización de Sid2p-Mob1p en la zona media de la célula.

Sid2p es una proteína que pertenece a la familia de quinasas NDR (nuclear Dbf2-related), altamente conservada en todos los organismos, que funciona asociada a Mob1p formando un complejo. Es posible que la falta de asociación de este complejo al anillo medio pueda compensarse con un aumento de su actividad, que permita eficazmente transmitir la señal SIN al sitio de división. Datos previos del laboratorio habían demostrado que la actividad quinasa de Sid2p desaparece en un mutante *etd1Δ*, por lo que se comprobó si el mutante *pab1-4* hiperactiva Sid2p-Mob1p en ausencia de Etd1p, contrarrestando así una deficiente localización en la zona media. Para ello se inmunoprecipitó la cepa Sid2-13Myc usando un anticuerpo anti-Myc y se analizó la actividad quinasa de esta proteína usando como sustrato de fosforilación MBP (Myelin Basic Protein) en diferentes cepas. De esta forma se observó que la actividad quinasa de Sid2p era alta y muy similar en el silvestre y en el mutante *pab1-4*. Sin embargo, en el doble mutante *etd1Δ pab1-4* la actividad se mantiene igual de baja que en la delección de *etd1* (Figura 1.5). Por tanto, podríamos decir que Etd1p es fundamental, no sólo para la correcta asociación de Sid2p-Mob1p en el anillo medio, sino también para mantener la actividad quinasa del complejo.

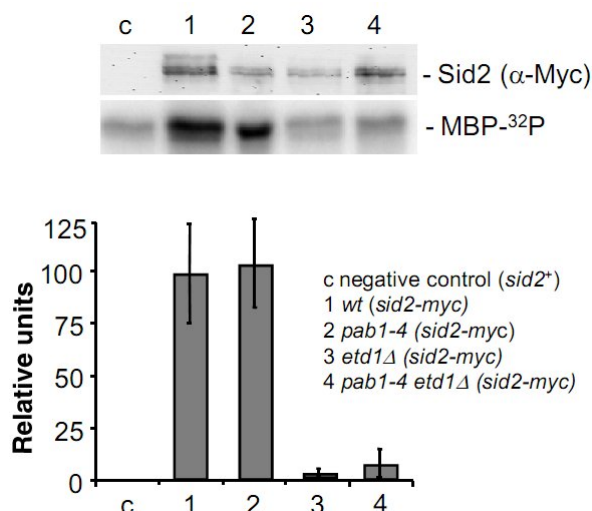


Figura 1.5. Etd1p es esencial para mantener la actividad quinasa del complejo Sid2p-Mob1p. Medida de la actividad quinasa de Sid2p en las cepas *wt*, *etd1Δ*, *pab1-4* y *etd1Δ pab1-4* expresando Sid2p-13Myc en su propio promotor. Las células fueron incubadas a 37°C (temperatura permisiva para *etd1Δ*) y posteriormente el cultivo se pasó a 25°C durante 3 horas (temperatura restrictiva). La actividad quinasa se determinó *in vitro* por la incorporación de ³²P al sustrato MBP (Myelin Basic Protein). Y la cantidad total de Sid2p fue analizada por western blot. Se usó un silvestre *sid2⁺* como control negativo del experimento (**Experimento realizado por Aurelia Lahoz**).

De estos resultados se puede concluir que las células *etd1Δ pab1-4* se dividen en ausencia de la función del complejo Sid2p-Mob1p. Por tanto, en ausencia de Etd1p, *pab1-4* puede activar la citocinesis directamente, por un mecanismo independiente de SIN.

1.4. Rho1p como activador de la citocinesis

La proteína Rho1p es una GTPasa que ha sido identificada en *S. pombe* como un regulador esencial de la síntesis de pared celular durante el crecimiento y formación del septo (Arellano et al., 1996; Nakano et al., 1997). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Rho1p activa la citocinesis en ausencia de actividad Sid2p, sugiriéndose que esta GTPasa actúa aguas debajo de la ruta de septación en el sitio de división (Jin et al., 2006). Por lo tanto, *pab1-4* podría estar activando la citocinesis, en ausencia de Etd1p y de la ruta SIN, mediante la activación de Rho1p.

Para comprobar esta posibilidad, se analizó si una mayor expresión de Rho1p, era capaz de suprimir también la letalidad de los mutantes *etd1Δ*. Para ello se expresó Rho1p bajo un promotor de expresión moderada, reprimible por tiamina (pREP41x), en una cepa *etd1Δ* a temperatura permisiva (37°C) durante 16 horas y posteriormente se realizó un ensayo de gota a temperatura restrictiva (25°C).

Como se observa en la Figura 1.6, una moderada expresión de Rho1p suprimía la falta de crecimiento de la delección de *etd1*. Además, mediante una tinción DAPI-Calcoflúor se vio que Rho1p era capaz de activar la citocinesis y restaurar la integridad celular en ausencia de Etd1p, al igual que ocurría con la pérdida de PP2A-Pab1p.

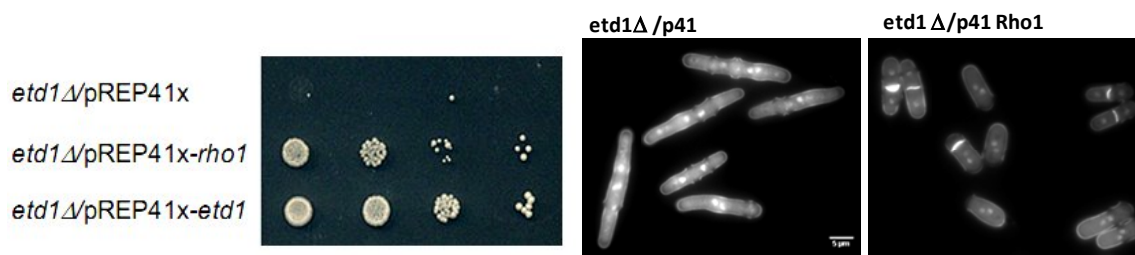


Figura 1.6. La sobreexpresión de Rho1p activa la citocinesis en ausencia de Etd1p. Ensayo de gota de cepas *etd1Δ* expresando Rho1p en el plásmido pREP41x. La sobreexpresión se realizó a 37°C durante 16 horas y posteriormente se hizo el ensayo de gota en placas de MM a temperatura restrictiva (25°C). Expresamos también el plásmido vacío como control negativo y Etd1p como control positivo. DAPI-Calcoflúor para ver fenotipo de las cepas *etd1Δ* y *etd1Δ nmt41xrho1*. (Barra de error 5μm)

Las GTPasas de la familia Rho, se encuentran activas cuando están unidas a GTP y se inactivan cuando este compuesto es hidrolizado a GDP. Este proceso de intercambio GDP-GTP es llevado a cabo por reguladores tipo GAP (GTPase Activating Protein) y tipo GEF (Guanine Exchange Factor). Los GEFs facilitan el cambio de GDP por GTP, activando a las GTPasas, mientras que las proteínas GAPs producen la hidrólisis del GTP, permitiendo a la GTPasa volver a su estado inactivo.

Para comprobar que Rho1p suprime la falta de Etd1p, se procedió a hiperactivar esta GTPasa a través de sus reguladores, comprobando si la delección de alguno de sus inhibidores (GAPs) o la sobreexpresión de algún activador (GEFs), rescata también la falta de crecimiento del mutante *etd1Δ*.

Hasta ahora se han identificado en *S. pombe* tres GEFs de Rho1p: Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, y tres reguladores negativos (GAPs), Rga1p, Rga5p y Rga8p (Calonge et al., 2003; Mutoh et al., 2005; Nakano et al., 2003; Nakano et al., 2001; Tajadura et al., 2004; Yang et al., 2003). Mientras Rgf1p y Rgf2p están implicados en la formación de la pared celular y el septo, se ha descrito que Rgf3p participa en citocinesis en *S. pombe* (Mutoh et al., 2005). En cuanto a los GAPs conocidos de Rho1p, se ha visto que la eliminación de *rga1* ralentiza el crecimiento y produce alteraciones morfológicas similares a las producidas por la sobreexpresión de Rho1p (Nakano et al., 2001) y *rga5* participa en la regulación de la actividad β -1,3-glucan sintasa y el mantenimiento de la integridad celular (Calonge et al., 2003). Por su parte, *rga8* se aisló a partir de una búsqueda de proteínas que interaccionaban con Pak1/Skh1p pero su función apenas se conoce (Yang et al., 2003).

Para hacer los dobles mutantes con los GAPs, se usó la cepa *etd1::ura4 nmt81xetd1*. Esta cepa lleva integrado *etd1* bajo un promotor de expresión débil (*nmt81*) reprimible por tiamina. Cuando se añade tiamina a un cultivo de esta cepa, Etd1p desaparece y las células presentan fenotipo SIN por debajo de 37°C. En el ensayo de gota a 25°C con tiamina (condiciones restrictivas) se puede observar como las delecciones de *rga1* y *rga5* suprimen la falta de crecimiento del mutante *etd1Δ*, mientras que *rga8* no está implicado en esta regulación (Figura 1.7A). Los fenotipos observados mediante tinción con DAPI-Calcoflúor muestran como los dobles mutantes con *rga1* y *rga5* son ahora capaces de septar (Figura 1.7B).

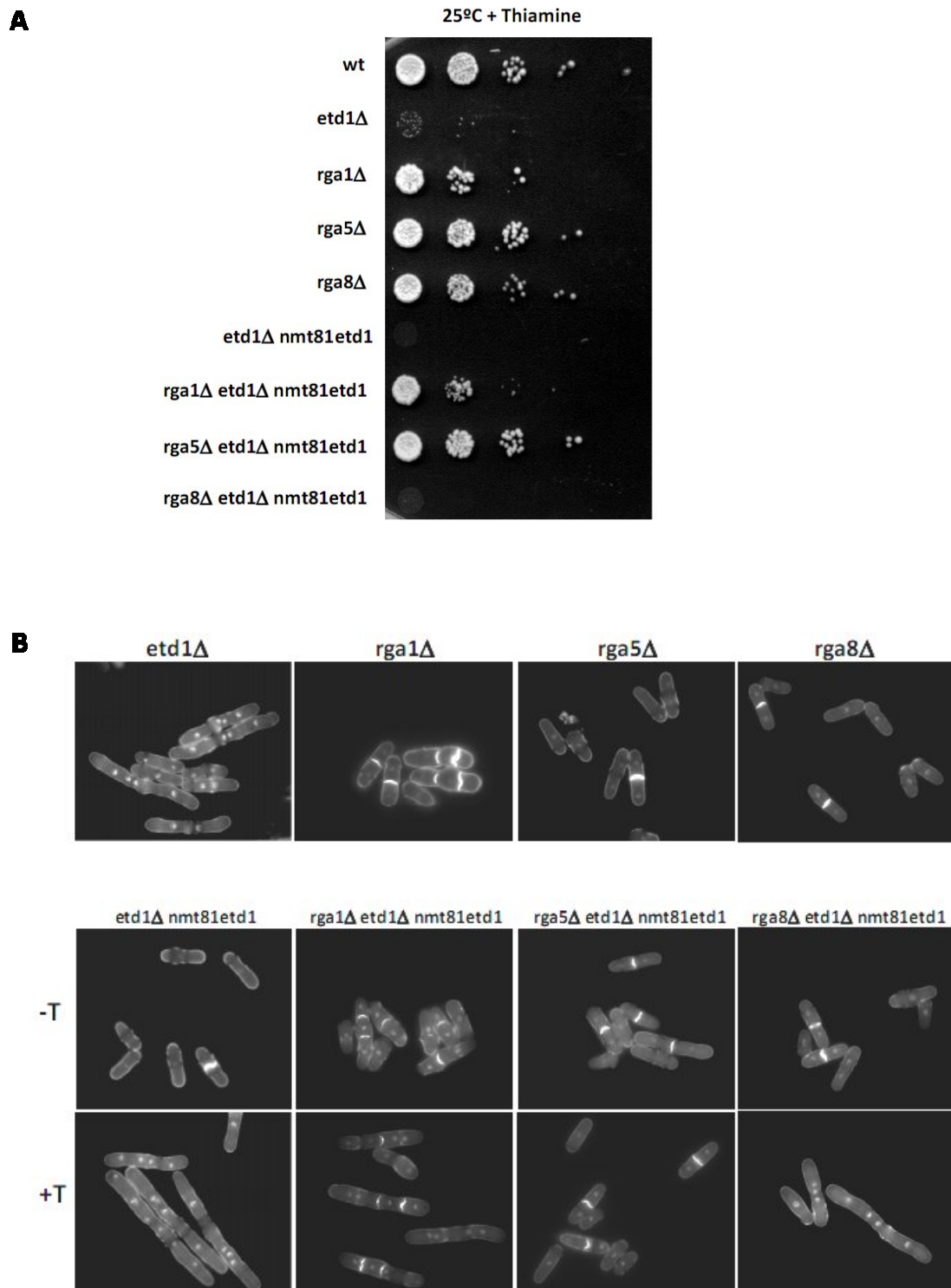


Figura 1.7. La delección de *rga1* y *rga5* rescata a *etd1Δ*. A) Ensayo de gota realizado en placas de medio rico (con Tiamina) a temperatura restrictiva (25°C). B) DAPI-Calcoflúor para observar el fenotipo.

La otra forma de aumentar la cantidad de Rho1p activo es a través de la sobreexpresión de sus GEFs. Para ello transformamos una cepa *etd1Δ* con cada uno de los GEFs conocidos para Rho1p, usando un plásmido con un promotor de expresión moderada (pREP41) reprimible por tiamina. Sorprendentemente, se observó que las sobreexpresiones de Rgf1p y Rgf3p, pero no la de Rgf2p son capaces de rescatar la falta de crecimiento de la delección de *etd1* (Figura 1.8)

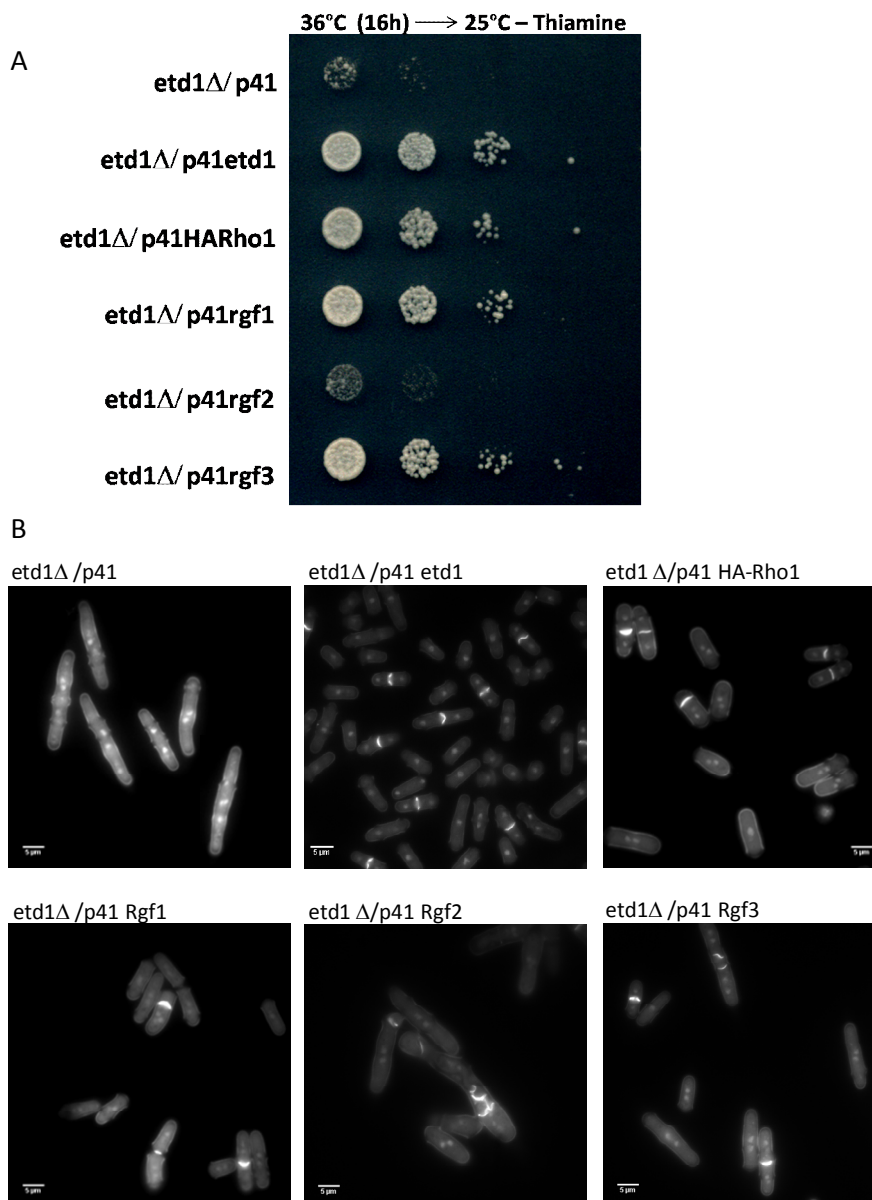


Figura 1.8. Las sobreexpresiones de Rgf1p y Rgf3 suprimen los defectos de crecimiento de *etd1Δ*. A) Ensayo de gota de cepas *etd1Δ* expresando Rho1p-GEFs en el plásmido pREP41x. La sobreexpresión se realizó a 37°C durante 16 horas y posteriormente se hizo el ensayo de gota en placas de MM a temperatura restrictiva (25°C). Expresamos también el plásmido vacío como control negativo y Etd1p y Rho1p como control positivo. B) Tinción DAPI-Calcoflúor para observar el fenotipo.

De estos resultados se concluye que la hiperactivación de Rho1p por sobreexpresión, o mediante la modificación de sus reguladores específicos, suprime eficazmente la ausencia de Etd1p en las células, con igual eficacia que lo hace la mutación *pab1-4*. En consecuencia, Etd1p puede estar regulando específicamente a Rho1p, de forma antagónica al complejo PP2A-Pab1.

Como ya habíamos visto que la pérdida de Pab1p recuperaba la actividad de Spg1p en mutantes *etd1Δ*, se analizó si la hiperactivación de Rho1p tenía alguna influencia en la actividad de Spg1p en células deficientes para Etd1p. Para ello, se expresó Rho1p durante 16 horas a temperatura permisiva (37°C), usando el plásmido pREP41x en una cepa silvestre y en una delecionada para *etd1*, y posteriormente se analizó la localización de Cdc7p-Tomato a 25°C (temperatura restrictiva) mediante microscopía, como medida indirecta de la actividad de Spg1p.

Como se muestra en la Figura 1.9, mientras que la sobreexpresión de Rho1p en un fondo silvestre no parece causar efectos significativos sobre la actividad de Spg1p, se observa que la sobreexpresión de Rho1p en una cepa *etd1Δ*, además de rescatar los defectos de crecimiento y septación, también restaura la actividad de Spg1p en este mutante e incluso recupera la asimetría. Sorprendentemente, la cinética de activación de Spg1p cuando expresamos Rho1p en el mutante *etd1Δ* es muy similar a la que presenta el doble mutante *etd1Δ pab1-4*, indicando que la falta de función de Pab1p y un exceso de Rho1p podrían compartir un mecanismo común para la activación de Spg1p.

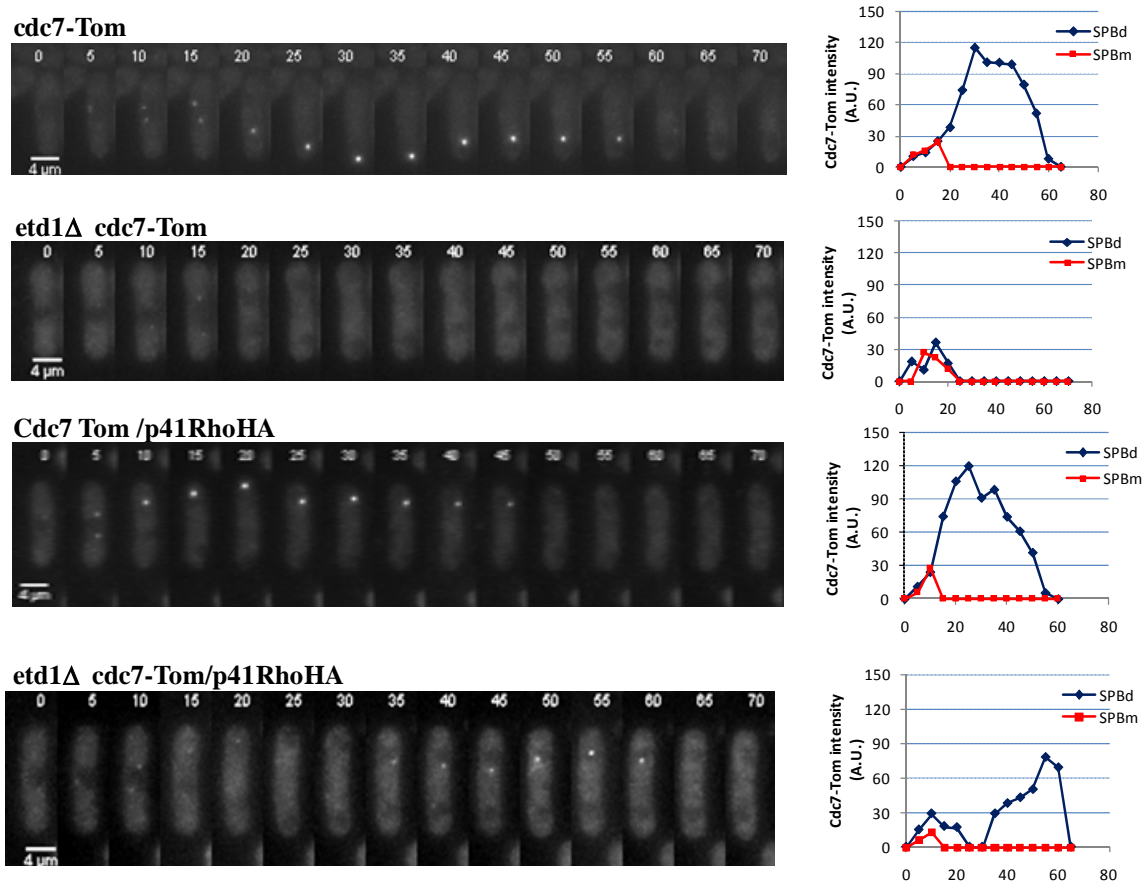


Figura 1.9. Rho1p rescata la actividad de Spg1p en el mutante *etd1Δ*. Proyección máxima (14 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc7p-Tom a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada (unidades arbitrarias) y representada para cada SPB (SPBd: daughter and SPBm: mother).

Para comprobar si la activación de Spg1p por un exceso de Rho1p se debe a un exceso de su actividad, se estudió la localización de Cdc7p-Tomato en cepas carentes del inhibidor de Rho1p, Rga5, ya que la delección de este GAP es la que mejor suprime la letalidad de los mutantes carentes de Etd1p. Como se observa en la Figura 1.10, Spg1p recupera su actividad normal en el doble mutante *rga5Δ etd1Δ*, ya que Cdc7p localiza asimétricamente como en un silvestre.

Esto demuestra que Rho1p puede activar directamente la GTPasa Spg1p, e incluso que Etd1p no es necesario para generar la asimetría en la activación de Spg1p.

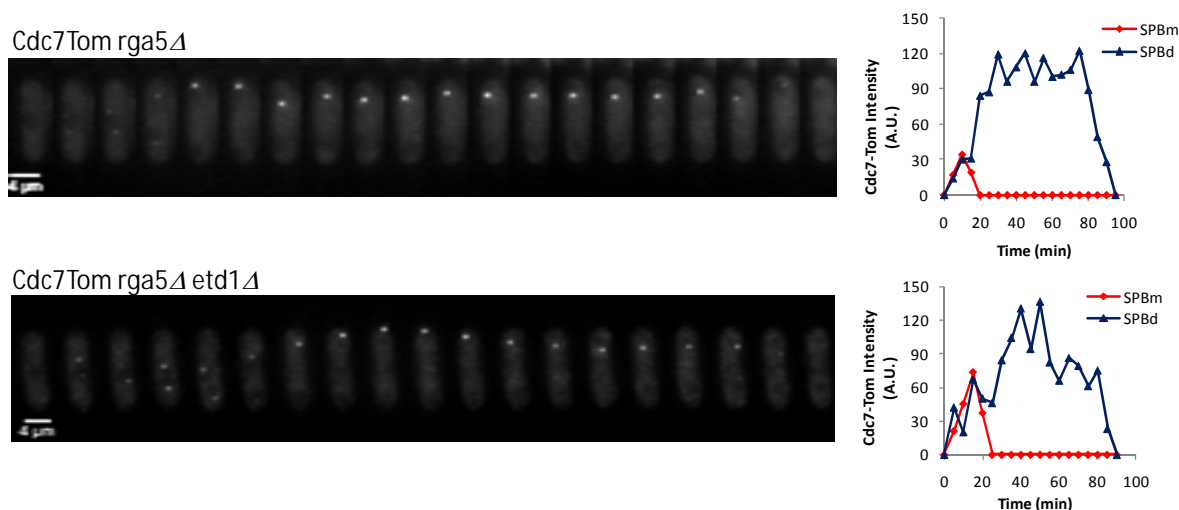


Figura 1.10. La delección del GAP de *rho1*, *rga5*, recupera la actividad de Spg1p en ausencia de *etd1*. Proyección máxima (14 planos de 0,5 μm) de la localización de Cdc7-Tom a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada (unidades arbitrarias) y representada para cada SPB (SPBd: daughter and SPBm: mother).

Como sabíamos que la falta de actividad de Pab1p restaura la actividad de Spg1p en ausencia de Etd1p, pero no es capaz de relocalizar el complejo Sid2p-Mob1p al anillo, quisimos ver si pasaba lo mismo cuando recuperábamos la actividad de Spg1p en un fondo *etd1Δ* al sobreexpresar Rho1p. Efectivamente, se observó que la falta de Etd1p impide la correcta localización de Mob1p en el anillo, incluso cuando Spg1p está activo por la sobreexpresión de Rho1p (Figura 1.11).

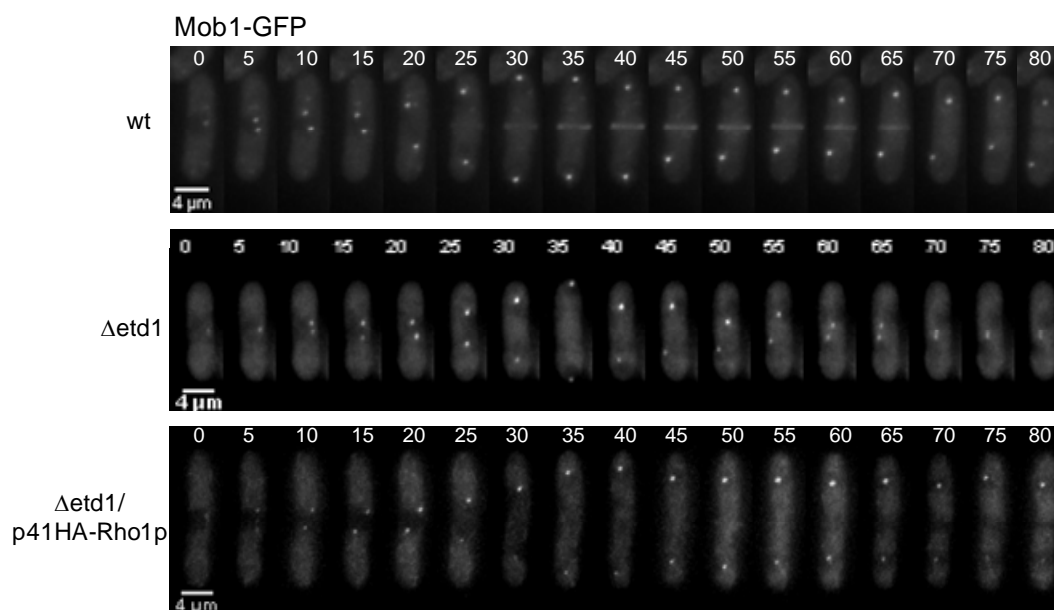


Figura 1.11. La sobreexpresión de Rho1p no relocaliza a Mob1p en el anillo en ausencia de Etd1p A) Proyección máxima (14 planos de 0,5 μm) de la localización de Mob1p-GFP a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos.

1.5. Regulación de la actividad de Rho1p por Etd1p y PP2A-Pab1p

Los datos genéticos sugieren un papel específico de Etd1p en la activación de Rho1p. Como ya se ha mencionado, el mutante *etd1Δ* presenta serios defectos en la integridad de la pared celular, característica asociada a una falta de regulación de la síntesis de pared y formación del septo primario, llevada a cabo por la β -1,3-glucan sintasa a través de Rho1p (Arellano et al., 1996; Nakano et al., 1997). Además, a pesar de que Etd1p haya sido descrito como activador de Spg1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009), esta proteína es la única de la ruta SIN que localiza en las puntas de la célula y el septo, al igual que Rho1p y los demás componente de la maquinaria de biosíntesis de la pared celular (Daga et al., 2005). Como la localización de las proteínas suele estar relacionada con su función, nos planteamos si tal vez Etd1p podría estar regulando la actividad de Rho1p, de forma antagónica a PP2A-Pab1p.

Para comprobar esta hipótesis, se analizaron los niveles de Rho1p-GTP (forma activa de Rho1p) en un silvestre, y en los mutantes *etd1Δ*, *pab1-4* y *etd1Δ pab1-4*. Como *etd1Δ* puede crecer a 37°C, todas las cepas se incubaron a esta temperatura y posteriormente se pasaron a 25°C durante 3 horas para medir entonces la cantidad de Rho1p activa. Como se observa en la Figura 1.12 A, la cantidad inmunoprecipitada de Rho1p-GTP fue muy baja en las cepas que no presentaban Etd1p con respecto al silvestre y consistentemente con los datos anteriores esta cantidad se recupera en el doble *etd1Δ pab1-4*, lo que indica que Etd1p y PP2A-Pab1p pueden estar regulando la actividad de Rho1p.

Para mayor consistencia de este resultado, medimos los niveles de Rho1p-GTP en células sobreexpresando Etd1p y Pab1p. En el caso de Etd1p, se empleó un promotor moderado (pREP41x), ya que la sobreexpresión con un promotor más fuerte (*nmt1*) causa lisis celular (Daga et al., 2005; Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Como se muestra en la Figura 1.12 B, la sobreexpresión de Etd1p aumenta considerablemente los niveles de Rho1p-GTP, mientras que si tenemos más Pab1p en la célula los niveles de Rho1p activo disminuyen. Por tanto, Etd1p podría estar activando a Rho1p y Pab1p inhibiéndola, lo cual confiere a estas dos proteínas papeles contrarios en la regulación de Rho1p.

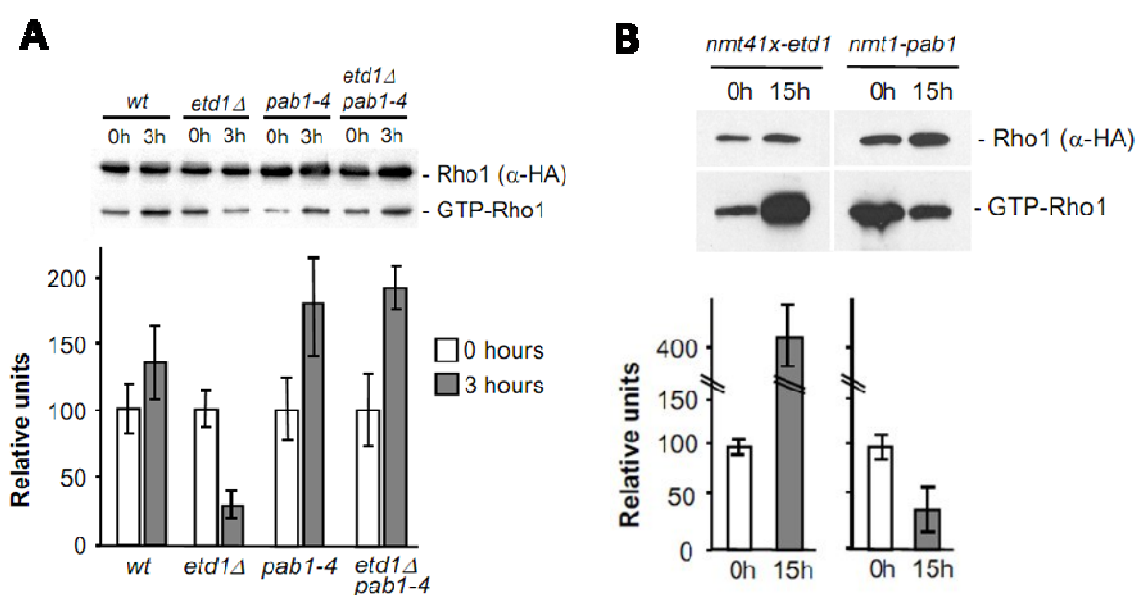


Figura 1.12. Etd1p y Pab1p ejercen papeles contrarios en la regulación de Rho1p. A) Medida de la cantidad de Rho1p activa comparándola con la cantidad total de Rho1p en un silvestre y en los mutantes *etd1Δ*, *pab1-4* y *etd1Δ pab1-4*. La cantidad total de HA-Rho1p se analizó por western blot usando un anticuerpo anti-HA. Para medir Rho1p-GTP (Rho1p activa) se incubaron los extractos con Glutation-Sefarosa, previamente unida a GST-RBD. Sólo cuando Rho1p está en su estado GTP es capaz de interaccionar con el dominio RBD. Se presentan las cuantificaciones del Rho1p-GTP. (Experimento realizado por Rafael R.Daga) B) El mismo experimento sobreexpresando 16 horas en un silvestre Etd1p y Pab1p bajo el promotor *nmt41x*.

Rho1p regula directamente la actividad de la β -1,3-glucan sintasa. En consonancia con los resultados anteriores, en el mutante *etd1Δ* disminuye la actividad β -1,3-glucan sintasa, mientras que el doble mutante *etd1Δ pab1-4* recupera la actividad (Figura 1.13)

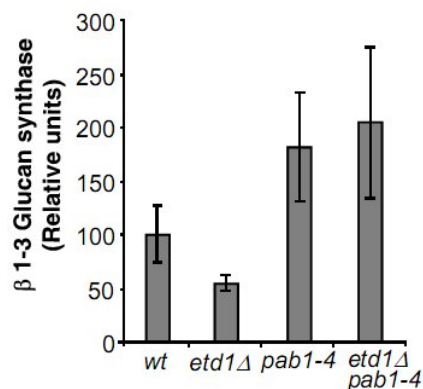


Figura 1.13. Medida de la actividad de la β-1,3-glucan sintasa. Las células fueron crecidas a 37°C y se pasaron durante 3 horas a temperatura restrictiva (25°C). La actividad fue medida siguiendo el protocolo de Arellano et al., 1997 (**Experimento realizado por Aurelia Lahoz**).

Globalmente, estos datos sugerirían para Etd1p un papel activador de Rho1p y de su diana β-1,3-glucan sintasa, mientras Pab1p ejercería un papel antagónico como inhibidor de esta GTPasa universalmente conservada.

Para saber si esta regulación se ejerce de forma directa o indirecta, se estudió una posible interacción física entre Etd1p y Rho1p, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación entre estas proteínas. Para ello se empleó la cepa HA-Rho1p sobreexpresando EGFP-Etd1p con un plásmido de expresión moderada (pREP41) durante 16 horas. Como se muestra en la Figura 1.14, Etd1p co-purifica con Rho1p en estos ensayos, lo cual indica que la activación de Rho1p por parte de Etd1p podría ser directa.

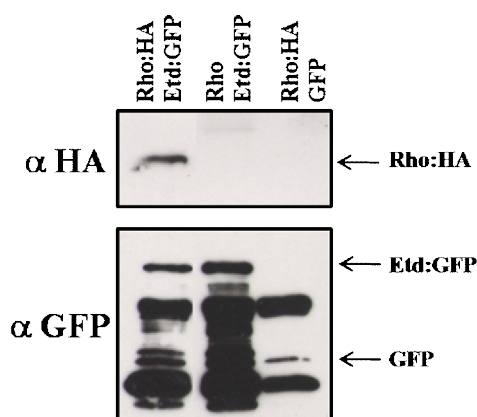


Figura 1.14. Etd1p interacciona físicamente con Rho1p. Extractos de células expresando EGFP-Etd1p en un fondo silvestre, EGFP en un fondo HA-Rho1p (como control negativo del experimento) o EGFP-Etd1p en un fondo HA-Rho1p fueron inmunoprecipitados con anti-GFP. Este inmunoprecipitado se corrió en un gel SDS-PAGE y se reveló usando anti-GFP (para ver la cantidad de EGFP-Etd1p inmunoprecipitada) y anti-HA (para ver la interacción)

En experimentos previos de nuestro laboratorio no se encontró interacción física entre Rho1p y Pab1p (Lahoz et al., 2010), lo que sugiere que PP2A-Pab1p podría estar inhibiendo la actividad de Rho1p a través de alguno de sus reguladores. De hecho, en otro trabajo de nuestro laboratorio se ha inmunoprecipitado Rga1p junto a la fosfatasa PP2A, lo que unido a la capacidad de este GAP de suprimir la delección de Etd1p sugiere que esta fosfatasa podría estar inhibiendo a Rho1p mediante la activación, por defosforilación, de Rga1p u otros GAPs de Rho1p, como Rga5p, cuya delección también suprime eficazmente la falta de Etd1p.

CAPÍTULO 2

Caracterización de diferentes dominios en Etd1p

2.1. Análisis informático de la secuencia de Etd1p para identificar su posible función molecular

Etd1p es una proteína de 391 aminoácidos y en procedimientos estándar su secuencia no presenta homologías significativas con la secuencia de otras proteínas conocidas (Daga et al., 2005). Aún así, en este capítulo se decidió profundizar en la búsqueda informática de posibles dominios y homologías que pudiera presentar esta proteína, con el fin de determinar su función molecular y su mecanismo de acción en la regulación de GTPasas.

Mediante la herramienta de búsqueda de dominios que ofrece ExPASy Prosite (<http://prosite.expasy.org/>) se observó que la proteína Etd1p no presenta ningún dominio que pueda ser determinante para su función o para su homología con otras proteínas. Sólo se encontraron algunas secuencias que suelen aparecer con frecuencia en este tipo de búsquedas, como posibles sitios de fosforilación por diferentes proteínas, sitios de miristoilación o de glicosilación. (Figura 2.1 y Tabla 2.1).

Etd1pSEQ1 (391 aa)

MGVVYGSQQNLSEYFYSSVNMAEVPDTEENRGHSFEGVTLQRRHVKGKMSYGS DITPRRPKQLGL
PKEVNTSECIDQGSWRKPSAFESLRYSRKFSKRIFSFIVGESKSTVQRNASGADSTLSHFTANE
INKGNCKKTALSNEFNSANKGSKASGVGAELPSVNGFIEGELHDDNETDSFRINELAKQIQETSLG
ATTQEDESSDGICWDELSTTSPESSKVSEPIIQDNTQTTHINNDSSDIRFSSRCDLFADDADSDWE
QDFNVKFDSPLIIPETVNSAGHTVREQLFEVKEFTRSIKDLKDLYEKANSKDIYDKDSEILGEAKA
ILRLADPANYSCLKDEDAQNILSKYKVKLEGDSSLDFDASMLPGLNDHVHYLMSQLQLLLH

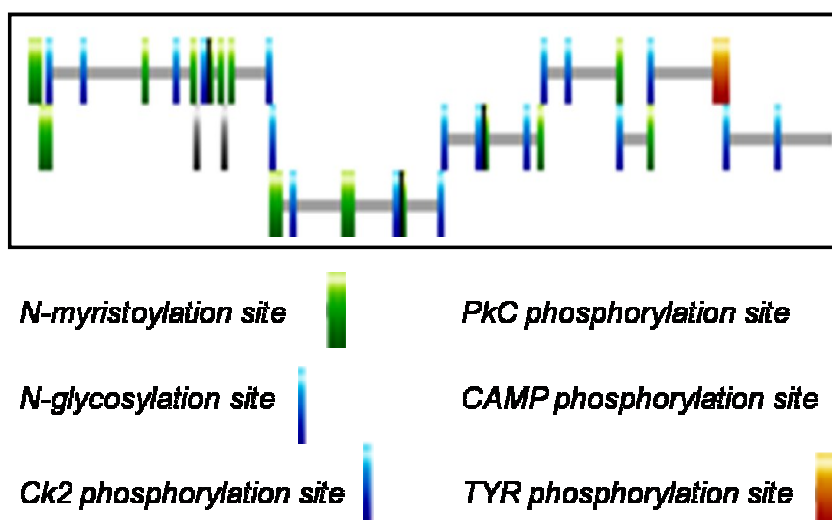


Figura 2.1. La proteína Etd1p no presenta dominios significativos. Secuencia de aminoácidos de Etd1p y perfil de dominios proporcionado por ExPASy Prosite

MYRISTYL N-myristoylation site	
2 - 7:	GWyGS
6 - 11:	GSqqNL
119 - 124:	GAdSTS
153 - 158:	GSkaSG
ASN_GLYCOSYLATION N-glycosylation site	
10 - 13:	NLSE
71 - 74:	NTSE
116 - 119:	NASG
178 - 181:	NETD
241 - 244:	NDSS
339 - 342:	NYSD
CK2_PHOSPHO_SITE Casein kinase II phosphorylation site	
27 - 30:	TfE
85 - 88:	SafE
118 - 121:	SgaD
129 - 132:	TanE
200 - 203:	TtqE
201 - 204:	TqeD
218 - 221:	TspE
250 - 253:	SrcD
261 - 264:	SdwE
287 - 290:	TvrE
301 - 304:	SikD
373 - 376:	SsID
PKC_PHOSPHO_SITE Protein kinase C phosphorylation site	
57 - 59:	TpR
80 - 82:	SwR
89 - 91:	SIR
94 - 96:	SrK
98 - 100:	SkR
182 - 184:	SfR
222 - 224:	SsK
249 - 251:	SsR
287 - 289:	TvR
301 - 303:	SiK
CAMP_PHOSPHO_SITE cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site	
82 - 85:	RKpS
95 - 98:	RKfS
TYR_PHOSPHO_SITE Tyrosine kinase phosphorylation site	
333 - 340:	Rla.DpanY

Tabla 2.1. Secuencia de los dominios de Etd1p

En *Saccharomyces cerevisiae* la ruta análoga a SIN se conoce como MEN (mitotic exit network). Esta ruta está gobernada por la GTPasa Tem1p, homóloga a Spg1p. Se sabe que Tem1p es inhibido por dos GAPs, Bub2p y Bfa1p (Geymonat et al., 2002) y se ha propuesto que puede ser activado por Lte1p, una proteína que presenta homología con un GEF de las Ras-GTPasas, Cdc25p (Keng et al., 1994; Shirayama et al., 1994). En *S. pombe* se había propuesto que Etd1p podía tener una función equivalente a Lte1p (Daga et al., 2005) y estudios recientes han demostrado que en efecto, Etd1p activa directamente a Spg1p, y que además, presenta una cierta similitud en su secuencia con Lte1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009), lo que lleva a estos autores a sugerir que Etd1p podría actuar como GEF de Spg1p. Para profundizar en esta idea, se analizó la secuencia de Etd1p mediante la herramienta BLASTp, con especial atención a posibles similitudes con proteínas reguladoras de GTPasas. De esta forma, se encontró que Etd1p presenta una cierta identidad, en el límite de ser estadísticamente significativa, con el GEF de Rho1p, Rgf2p, aunque sorprendentemente, también presenta cierta similitud con Rga2p, una proteína inhibidora tipo GAP de la GTPasa Cdc42p, una actividad molecular contraria a la propuesta para Etd1p (Figuras 2.2 y 2.3)

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score
SPAC1006.08 etd1 ethanol-hypersensitive mutant protein ...	2015	
3.0e-210	1	
SPBC83.03c tas3 RITS complex subunit 3 Schizosaccharom...	107	
0.00014	1	
SPBC1711.05 nucleocytoplasmic transport chaperone Srp4...	99	
0.00078	1	
SPAC1002.10c sgt1 SGT1 family protein Sgt1 Schizosaccha...	91	
0.0085	1	
SPAC26A3.09c rga2 GTPase activating protein Rga2 Schizo...	94	
0.0099	1	
SPBC1773.07c sbp1 yrb1 Ran GTPase binding protein Sbp1 S...	82	
0.017	1	
SPAC31G5.10 eta2 Myb family transcriptional regulator E...	86	
0.028	1	
SPAC458.07 tfa1 SPAPYUG7.01 transcription factor TFIIE a...	83	
0.044	1	
SPAC140.02 gar2 GAR family Schizosaccharomyces pombe ch...	83	
0.050	1	
SPAC6G9.06c pcp1 pericentrin Pcp1 Schizosaccharomyces p...	87	
0.053	1	
SPAC1006.06 rgf2 RhoGEF Rgf2 Schizosaccharomyces pombe ...	84	
0.10	1	
SPBC215.13 sequence orphan Schizosaccharomyces pombe c...	78	
0.18	1	
SPCC1739.11c cdc11 SIN component scaffold protein Cdc11...	81	
0.19	1	
SPBC17G9.08c csx2 Arf GAP protein Schizosaccharomyces p...	79	
0.24	1	

Figura 2.2. Resultados del BLASTp de Etd1p con la base de datos de *S. pombe*.

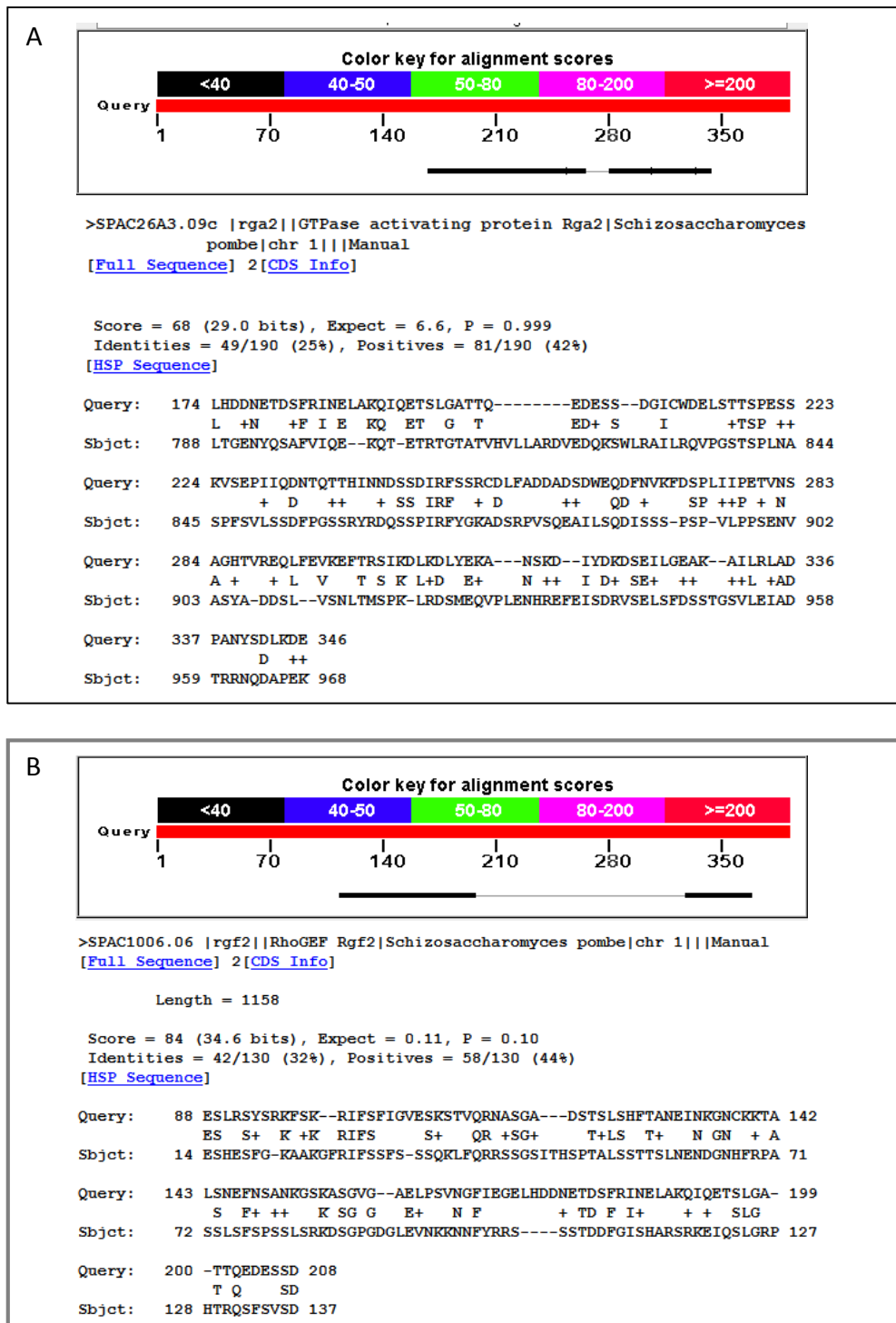


Figura 2.3. Homología entre fragmentos de Etd1p con el GAP de Cdc42p, Rga2p (A) y el GEF de Rho1p, Rgf2p (B)

2.2. Análisis funcional de Etd1p

Sabemos que la proteína Etd1p se localiza anclada a la membrana de la célula y ejerce una función en la regulación de las GTPasas Rho1p y Spg1p. Para determinar en qué parte de la proteína radica cada una de estas funciones, se diseñaron una serie de deleciones seriadas a fin de determinar el dominio mínimo necesario para cada una de ellas (Figura 2.4).

La estrategia seguida fue amplificar por PCR diferentes fragmentos de Etd1p y clonarlos en un plásmido de expresión moderada fusionados a la EGFP en el extremo amino (pREP41-EGFP).

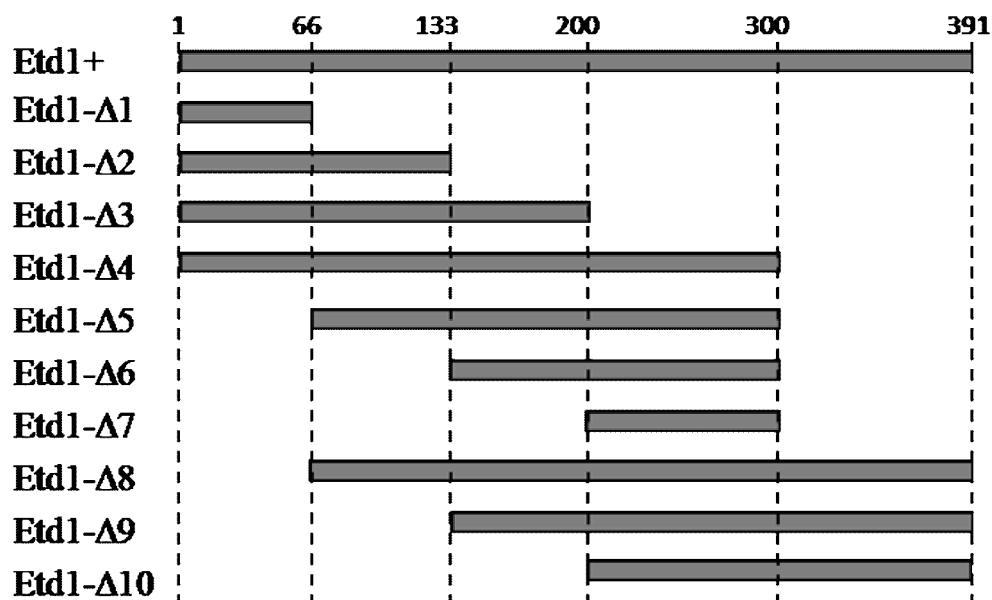


Figura 2.4. Colección de fragmentos de Etd1p. El tamaño de los fragmentos se indica en aminoácidos.

Posteriormente estos plásmidos se transformaron en una cepa silvestre para el estudio funcional de su localización y en un mutante *etd1Δ*, para el análisis funcional de su actividad.

2.2.1. Un dominio N-terminal de Etd1p determina su localización

La localización de Etd1p varía a lo largo del ciclo celular; durante interfase se localiza en los puntos de crecimiento y cuando tiene lugar la división de las células se encuentra en la región media. Además haciendo protoplastos de células de *S. pombe* se puede observar que Etd1p forma parte de la membrana o se une a ésta mediante la interacción con otras proteínas. Por tanto, uno de los objetivos que se plantearon en este proyecto fue identificar experimentalmente el dominio mínimo responsable de la localización de Etd1p.

Utilizando las deleciones que habíamos construido fusionadas a EGFP, se analizó la localización de los diferentes fragmentos de Etd1p tras 18 horas de expresión con el promotor *nmt41* en una cepa silvestre. Los resultados se muestran en la Figura 2.5.

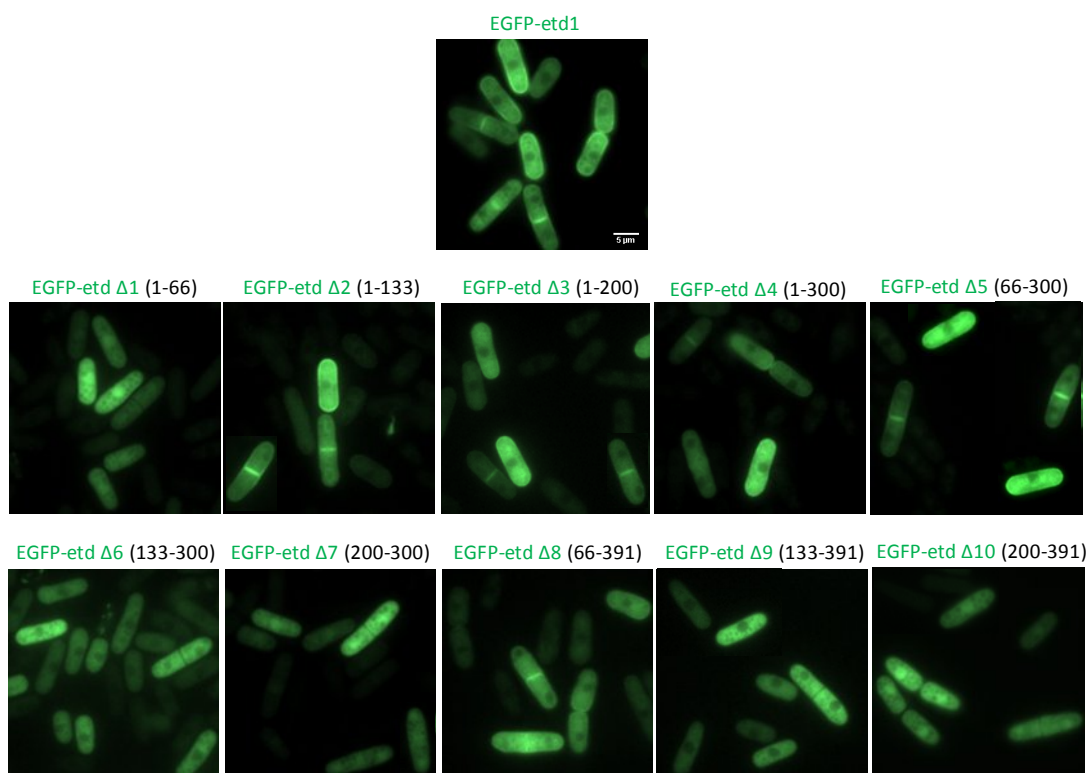


Figura 2.5. Localización de los diferentes fragmentos de Etd1p. Los cultivos fueron crecidos a 25°C expresando los fragmentos 18 horas sin tiamina. Se muestra también la localización de la proteína completa. Barra de error (5μm).

Como puede observarse en la Figura. 2.5, existen tres patrones diferentes de localización de los distintos fragmentos, resumidos en la Tabla 2.2:

- Localización silvestre, unida a membranas ($\Delta 2,3,4,5$ y 8)
- Localización citoplasmática ($\Delta 6$ y 9)
- Localización citoplasmática y nuclear (en los fragmentos $\Delta 1,7$ y 10)

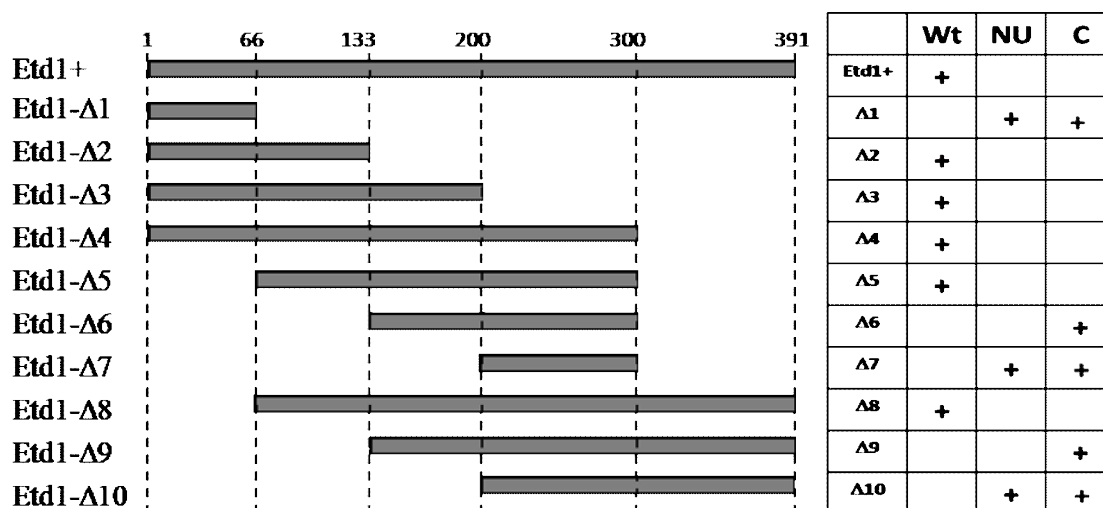


Tabla 2.2. Localización de los diferentes fragmentos de Etd1p. Wt (localización silvestre); NU (localización nuclear) y C (localización citoplasmática).

No entendemos muy bien por qué hay construcciones que entran en el núcleo, aunque lo que sí sabemos es que la entrada debe ser por un transporte activo, ya que está descrito que la GFP sola no es capaz de entrar en el núcleo (Kadura et al., 2005).

Una de las principales conclusiones que pueden salir de este experimento es que todos los fragmentos que conservan la localización silvestre tienen en común la parte de la proteína que va del aminoácido 66 al 133. Por tanto, se decidió expresar este pequeño fragmento fusionado a la EGFP y ver si era suficiente para determinar la localización silvestre de la proteína completa. Efectivamente, se comprobó que este fragmento es el responsable de la localización de Etd1p en la membrana (Figura 2.6)

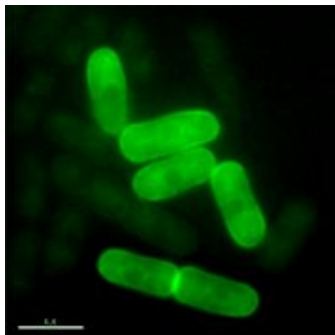
etd Δ 11-GFP (66-133)

Figura 2.6. El fragmento Δ 11 (66-133 aminoácidos) es responsable de la localización de Etd1p. El cultivo se creció a 25°C expresando el fragmento 18 horas sin tiamina. Barra de error (6,6 μ m).

Además, para definir aún más el fragmento determinante de la localización, se construyeron los fragmentos 66-100 aa y 100-133 aa fusionados a la EGFP. Sin embargo, tras su expresión en las mismas condiciones, no se observó un patrón de localización silvestre en ninguno de ellos.

Posteriormente, para asegurarnos de que esta localización no se debía a que los fragmentos se unían al Etd1p endógeno, se realizó el mismo experimento pero expresando los fragmentos en un mutante *etd1* Δ . Esta vez los cultivos se incubaron a 37°C, ya que es la temperatura a la que es capaz de crecer este mutante. En estas condiciones se observaron las mismas localizaciones de los distintos fragmentos que cuando se expresaron en la cepa silvestre.

Por lo tanto, mediante esta aproximación funcional se ha podido identificar una región N-terminal, desde el aminoácido 66 hasta el 133, que define un dominio necesario y suficiente para la localización silvestre de Etd1p en la membrana y además, curiosamente, este fragmento es el que presenta cierta homología con el GEF de Rho1p, Rgf2p.

2.2.2. Un dominio C-Terminal de Etd1p determina su actividad molecular

Mediante este sistema de deleciones también se analizó qué dominio de la proteína es responsable de su función. Para ello se transformó una cepa sin Etd1p con cada uno de los fragmentos y se observó su capacidad para complementar la falta de función. Los cultivos se crecieron a 37°C y posteriormente se hizo un ensayo de gota en placas de MM sin leucina, a 25°C (temperatura restrictiva para la deleción de *etd1*) con y sin tiamina (Figura 2.7).

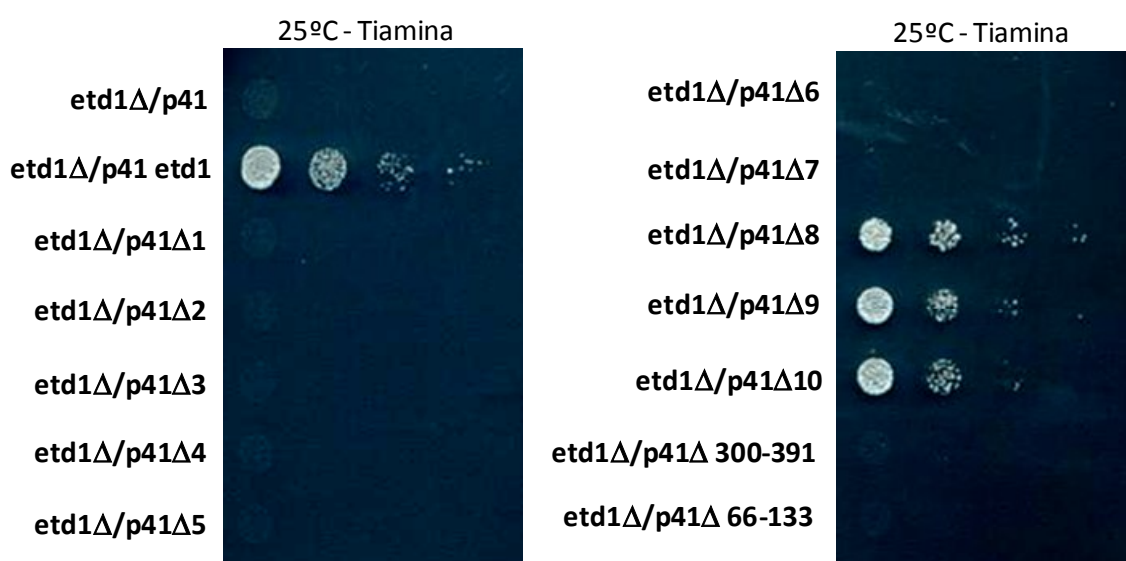


Figura 2.7. El fragmento funcional de Etd1p corresponde con el dominio C-terminal de la proteína. Ensayo de gota para ver la complementación de la falta de función de Etd1p. Los cultivos se incubaron a 37°C con tiamina, se lavaron para eliminar la tiamina y se hizo el ensayo en placas de MM-Leucina sin tiamina y a 25°C.

De esta forma se determinó que los fragmentos que son capaces de complementar la deleción de *etd1* son aquellos que poseen la parte final de la proteína. Estos fragmentos complementan incluso con tiamina, lo que indica que la baja expresión de Etd1p que se obtiene con el pREP41 reprimido es suficiente para que Etd1p realice su función en la célula.

Para un mayor análisis de la complementación funcional, se examinaron células teñidas con DAPI-Calcoflúor de cada una de las construcciones en un fondo genético sin *etd1* (Figura 2.8).

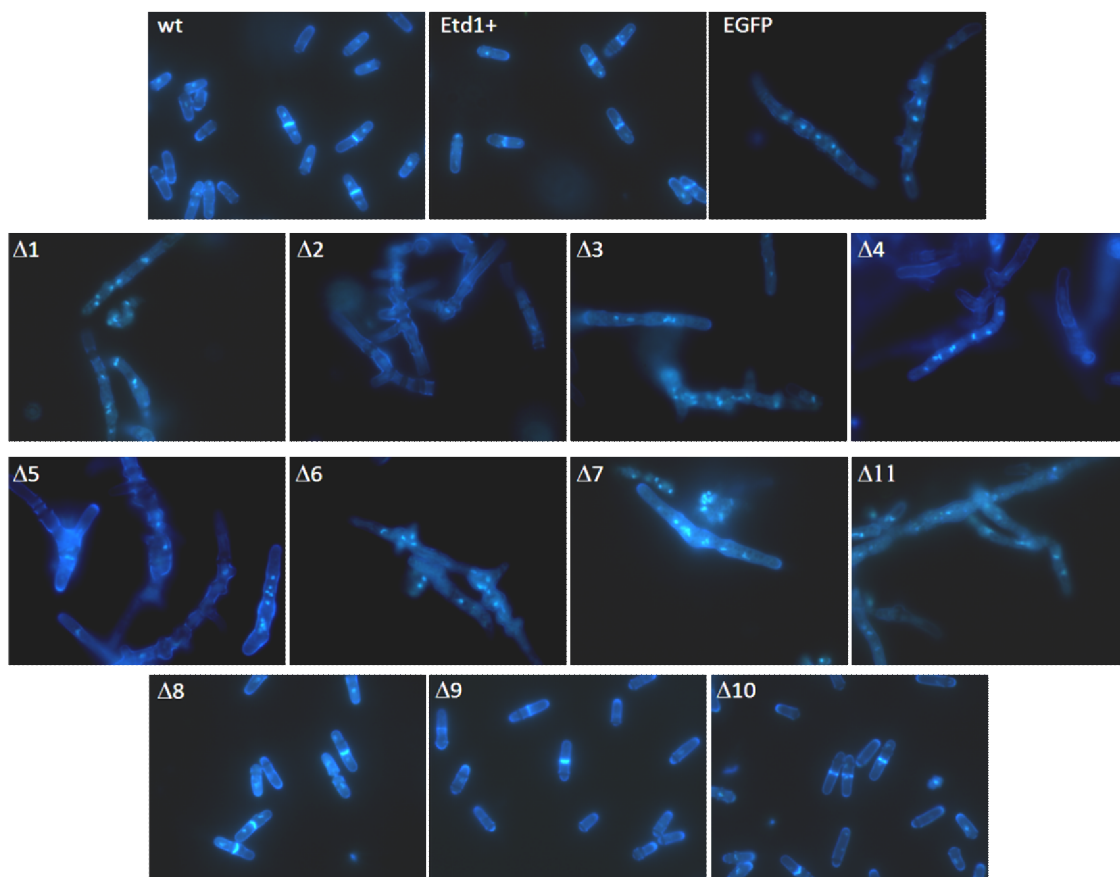


Figura 2.8. El extremo C-Terminal de Etd1p es el responsable de la función. Los cultivos se crecieron a 37°C (temperatura permisiva), expresando los fragmentos sin tiamina. Posteriormente se pasaron a 25°C durante 8 horas y se fijaron las células.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el fragmento C-terminal de la proteína es el responsable de la función de la misma. Esta región es la que presenta cierta homología con el GAP de Rho1p, Rga2p. Por tanto Etd1p se parecería a un GEF en su dominio de unión a membrana y a un GAP en su dominio de función, lo que podría sugerir que Etd1p representaría un nuevo tipo de regulador de GTPasas.

2.2.3. Relación entre la localización de Etd1p y su función molecular

Es interesante que dentro de estos fragmentos que complementan la falta de función de la pérdida de Etd1p, se distinguen tres situaciones diferentes:

- El fragmento $\Delta 8$ (66-391aa) es el único de los tres que localiza como un silvestre, conservando el dominio de unión a membrana, y además complementa la falta de función de la pérdida de Etd1p.
- El fragmento $\Delta 9$ (133-391aa) pierde la localización en la membrana, encontrándose ahora por el citoplasma.
- Y el fragmento $\Delta 10$ (200-391aa) que además de encontrarse por el citoplasma, entra en el núcleo.

Esto demostraría que la localización y la función molecular son dominios independientes y que ambos aspectos de la proteína pueden separarse (Figura 2.9)

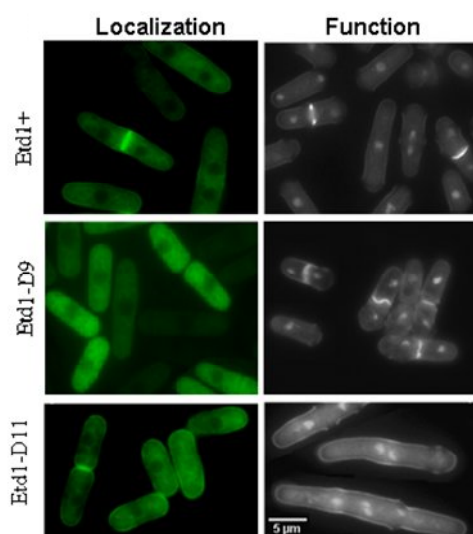


Figura 2.9. Independencia de la localización y la función molecular de Etd1p en distintos dominios. Se muestra la expresión de la proteína completa y de los dominios $\Delta 9$ (133-391aa) y $\Delta 11$ (66-133aa).

La localización de una proteína suele estar asociada con su función. Por tanto, ¿cómo fragmentos que pierden la localización silvestre son capaces de hacer crecer a la célula en ausencia de Etd1p? Para poder dar una respuesta a esta pregunta, se cuantificaron los niveles de expresión de estos fragmentos mediante western blot en las condiciones de complementación (bajo el promotor *nmt41*).

Para ello los fragmentos se expresaron en una cepa *etd1Δ* y se recogieron las células tras 18 horas de expresión sin tiamina. En la Figura 2.10 se puede observar cómo, cuanto más pequeño es el fragmento más se expresa dentro de la célula, posiblemente, debido a una menor degradación, ya que sabemos que Etd1p está sujeta a degradación vía ubiquitina a lo largo del ciclo (Daga et al., 2005).

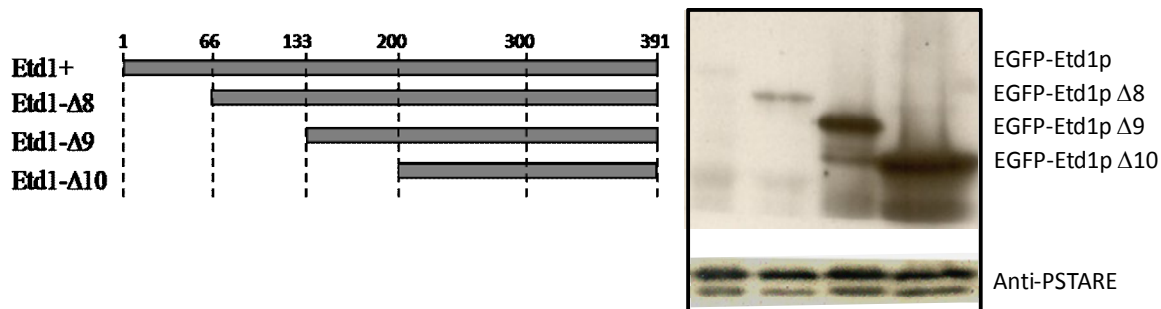


Figura 2.10. Cuanto más pequeño es el fragmento de Etd1p que estamos expresando, más cantidad de proteína hay en la célula. Los cultivos se crecieron a 37°C (temperatura permisiva), expresando los fragmentos 18 horas sin tiamina. Posteriormente se pasaron a 25°C durante 8 horas y se recogieron las células en RIPA (Buffer desnaturizante). El western blot se reveló usando un anticuerpo anti-GFP y para el control de carga se usó el anticuerpo anti-PSTARE.

Por tanto, podría ser que, aunque los fragmentos no localicen como en una cepa silvestre, la gran cantidad de Etd1p que hay por toda la célula, sea suficiente para acceder a su sustrato en la membrana (Rho1p) y complementar la falta de función.

Una sobreexpresión elevada de Etd1p imita el fenotipo de la falta de función de la proteína (Daga et al., 2005). En cambio, una expresión moderada de Etd1p (bajo el promotor *nmt41x*) no tiene efectos letales en la célula. Es interesante observar como la expresión moderada de estos fragmentos funcionales, al contrario que la proteína completa, ya presentan efectos negativos en la célula. Este efecto es muy evidente con la expresión del fragmento más pequeño (Δ10) (Figura 2.11), que en periodos de expresión por encima de 30 horas genera frecuentemente células con un fenotipo idéntico al de la falta de función de Etd1p, y al que se obtiene con muy alto nivel de expresión de Etd1p (cuando expresamos con el promotor *nmt3x*).

Como se ha descrito en la Figura 2.10, este fragmento es más abundante que los demás y mucho más que la proteína silvestre, en condiciones de expresión equivalentes. Así pues, posiblemente estos niveles moderados de expresión de proteína funcional truncada ya alcance una abundancia equivalente a los de la proteína silvestre con muy altos niveles de expresión.

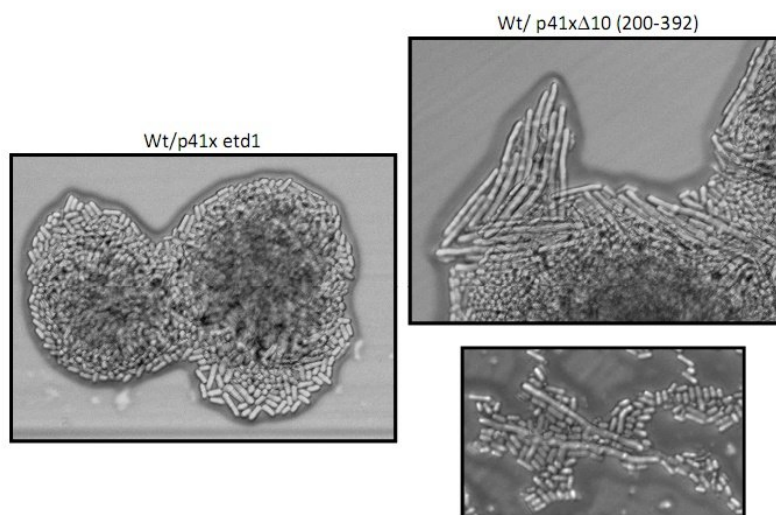


Figura 2.11. El fragmento Etd1- Δ 10 inhibe la citocinesis tras una elevada sobreexpresión. Fenotipo de células expresando durante más de 30 horas en placa, la proteína Etd1p y el fragmento Etd1- Δ 10.

2.3. La interacción con Rho1p tiene lugar en el extremo C-Terminal de Etd1p

El extremo carboxi-terminal de Etd1p es el responsable de su función molecular. Para determinar si su función en regular Rho1p está relacionada con la interacción física con esta GTPasa se analizó si los fragmentos que rescatan la falta de función de la proteína, eran capaces de interactuar con Rho1p al igual que lo hacía la proteína completa. Para ello se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación entre Rho1p y los fragmentos. Se expresaron los fragmentos marcados con EGFP desde el plásmido pREP41 en un fondo HA-Rho1p. Como control se expresó la EGFP sola en el mismo fondo HA-Rho1p (Figura 2.12).

Se observó, que al igual que Etd1p, estos fragmentos funcionales también son capaces de interactuar con Rho1p, por lo que se puede concluir que cualquiera que sea su función molecular, su mecanismo de acción posiblemente se ejerza mediante interacción física con esta GTPasa.

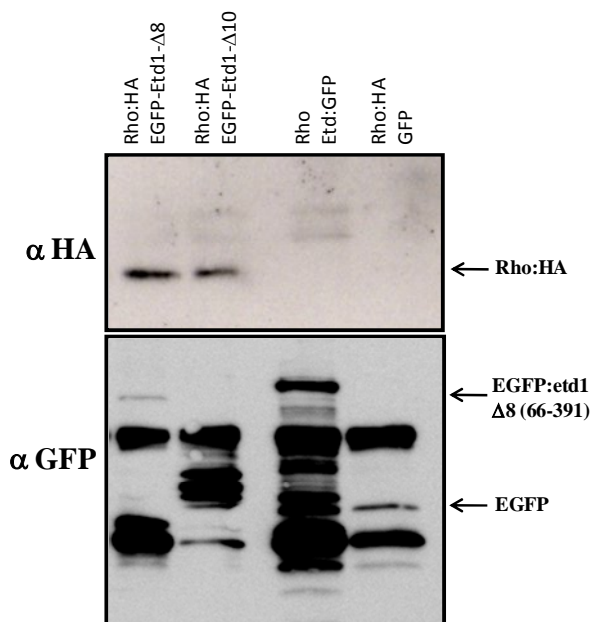


Figura 2.12. El extremo C-Terminal de Etd1p interacciona físicamente con Rho1p. Extractos de células expresando EGFP-Etd1-fragmentos en un fondo silvestre, EGFP en un fondo HA-Rho1p (como control negativo del experimento) o EGFP-Etd1p en un fondo HA-Rho1p fueron inmunoprecipitados con anti-GFP. Este inmunoprecipitado se corrió en un gel SDS-PAGE y se reveló usando anti-GFP (para ver la cantidad de EGFP-Etd1p inmunoprecipitada) y anti-HA (para ver la interacción). En el revelado anti GFP no podemos ver el fragmento Δ 10 porque coincide con la cadena pesada del anticuerpo.

Una vez que se había visto que los fragmentos funcionales de Etd1p interactuaban con Rho1p, se analizó si la expresión moderada de estas versiones truncadas afectaban a la actividad de Rho1p de la misma forma que lo hace la proteína completa (Figura 2.13).

Para ello, se midieron los niveles de Rho1p-GTP (forma activa de Rho1p), en células expresando los fragmentos Δ 8 y Δ 10 de Etd1p en plásmido, bajo un promotor moderado (pREP41).

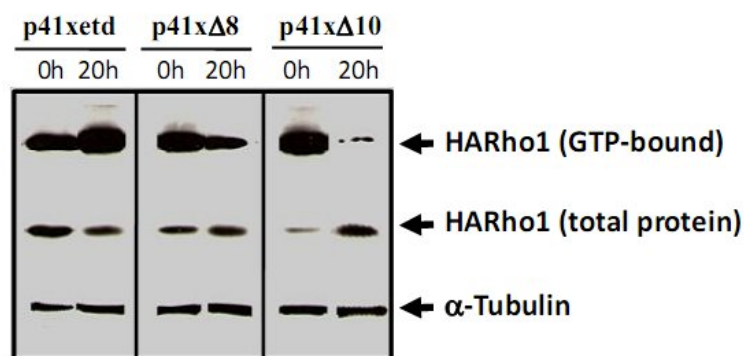


Figura 2.13. El fragmento Etd1- Δ 10 actúa como inhibidor de Rho1p. Medida de la cantidad de Rho1p activa comparándola con la cantidad total de Rho1p en células sobreexpresando Etd1p y los fragmentos Etd1- Δ 8 y Δ 10 durante 20 horas bajo el promotor nmt41x. La cantidad total de HARho1 se analizó por western blot usando un anticuerpo anti-HA. Para medir Rho1p-GTP (Rho1 activa) se incubaron los extractos con Glutation-Sefarosa, previamente unida a GST-RBD. Sólo cuando Rho1p está en su estado GTP es capaz de interaccionar con el dominio RBD.

Sorprendentemente, se observó que la sobreexpresión de estos fragmentos disminuía la cantidad de Rho1p activo, principalmente la sobreexpresión del fragmento más pequeño (Δ 10). Este resultado es difícil de explicar, ya que estos fragmentos son capaces de complementar la falta de función de Etd1p. Sin embargo, ya hemos visto que este fragmento es mucho más abundante en la célula que la proteína completa y que una expresión elevada (30 horas o más) termina originando células que vuelven a tener el fenotipo de la delección, es decir, células alargadas y multinucleadas. Tal vez, estos dominios, tras una elevada sobreexpresión, esten actuando como dominantes negativos, secuestrando a esta GTPasa.

2.4. La localización en la membrana de Etd1p no condiciona la activación de la ruta SIN.

Como ya se ha mencionado en el primer capítulo, la actividad de la ruta SIN puede analizarse indirectamente, observando al microscopio la unión de Cdc7p al SPB, ya que Cdc7p solamente se une a la forma activa de Spg1p (Spg1p-GTP) (Sohrmann et al., 1998). Se ha descrito que Etd1p localiza en la membrana y se libera de la misma para activar Spg1p e iniciar así la ruta SIN. Posteriormente, este Etd1p liberado se distribuye asimétricamente en la célula al final de citocinesis, siendo la intensidad de la fluorescencia más intensa en el compartimento en el que Cdc7p-GFP está apagado. Esto indica que Etd1p debe desaparecer totalmente del compartimento donde la ruta SIN se mantiene activa para que Spg1p pueda apagarse totalmente (Garcia-Cortes and McCollum, 2009).

Por esta razón, como habíamos identificado fragmentos de Etd1p capaces de complementar la falta de función de la proteína pero que no localizan en la membrana como en un silvestre y que además se expresan a mayores niveles, se decidió analizar la activación y el apagado de la ruta SIN en estas condiciones.

Para ello se estudió la localización de Cdc7p-Tomato y de EGFP-Etd1p a lo largo del tiempo, en una cepa *etd1Δ* expresando los fragmentos de Etd1p desde el plásmido pREP41, durante 18 horas sin tiamina. En particular, en este ensayo se utilizaron los fragmentos funcionales Δ8 y Δ10, ya que el primero tiene una localización silvestre y el segundo es el fragmento más pequeño que complementa pero no localiza en la membrana. Como control se empleó también la proteína completa fusionada a EGFP (Figura 2.14)

Se observó que en las tres cepas utilizadas, Cdc7p se localiza asimétricamente en los SPBs, por lo que se restaura la actividad de Spg1p. Respecto a la activación de Spg1p, se observa que Cdc7p se localiza primero en ambos SPBs y luego permanece asimétricamente en uno de ellos en todas las cepas utilizadas, por lo que se puede afirmar que los dos fragmentos restauran perfectamente la cinética de activación de Spg1p en estas cepas.

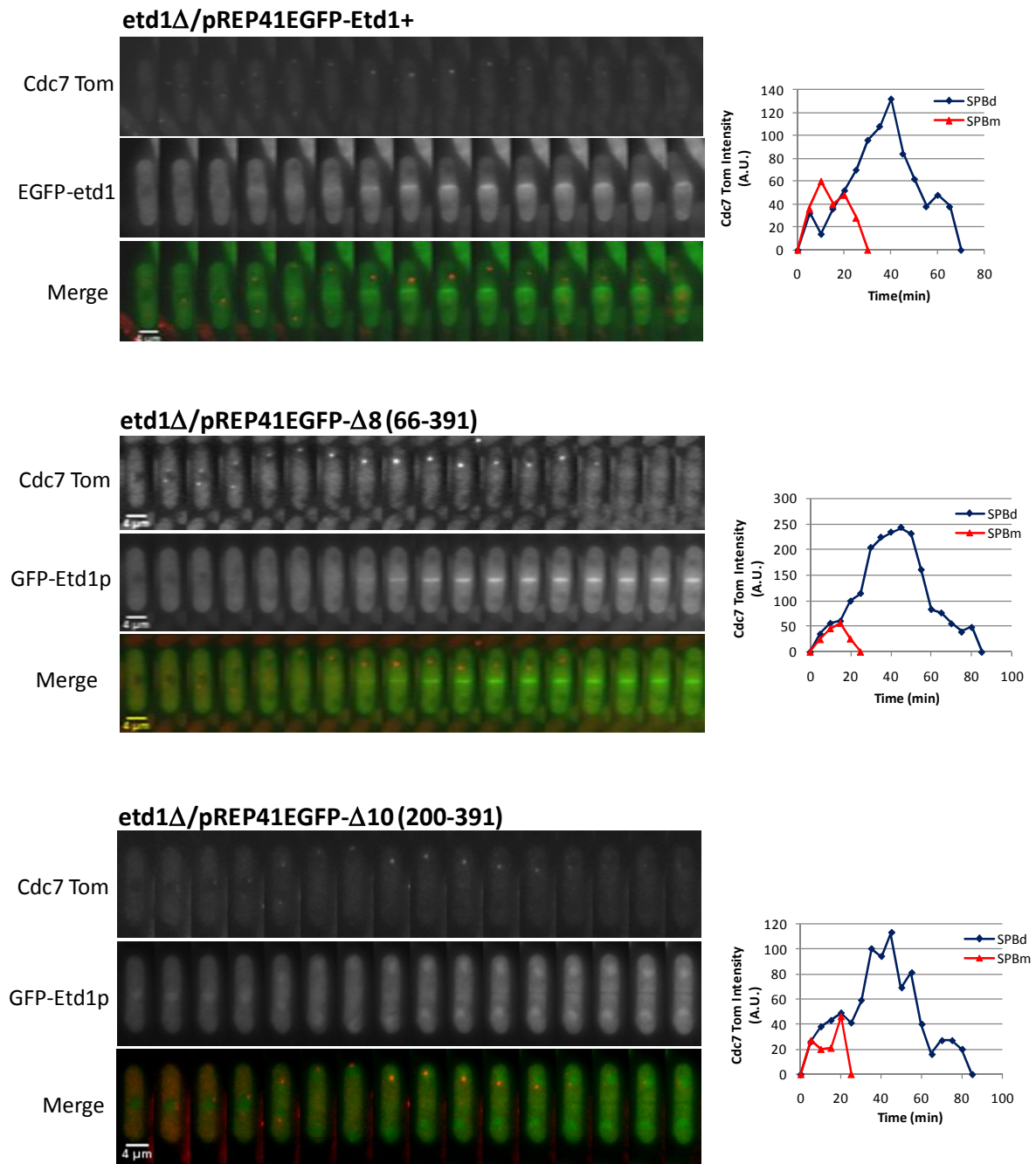


Figura 2.14. La sobreexpresión de los fragmentos funcionales de Etd1p restaura la actividad de Spg1p A) Proyección máxima (14 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc7-Tom, EGFP-Etd1p y la colocalización de los dos, a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada (unidades arbitrarias) y representada para cada SPB (SPBd: daughter and SPBm: mother).

Respecto al apagado de la ruta SIN, se deben considerar dos situaciones diferentes:

- En la expresión del fragmento $\Delta 8$ puede observarse que, aunque la proteína se localiza en la membrana y sigue un patrón de localización similar al de la proteína completa, no existe asimetría en su localización al final de citocinesis (Figura 2.15) y, sin embargo, en esta construcción la ruta SIN se apaga totalmente, como se muestra en la Figura 2.14.

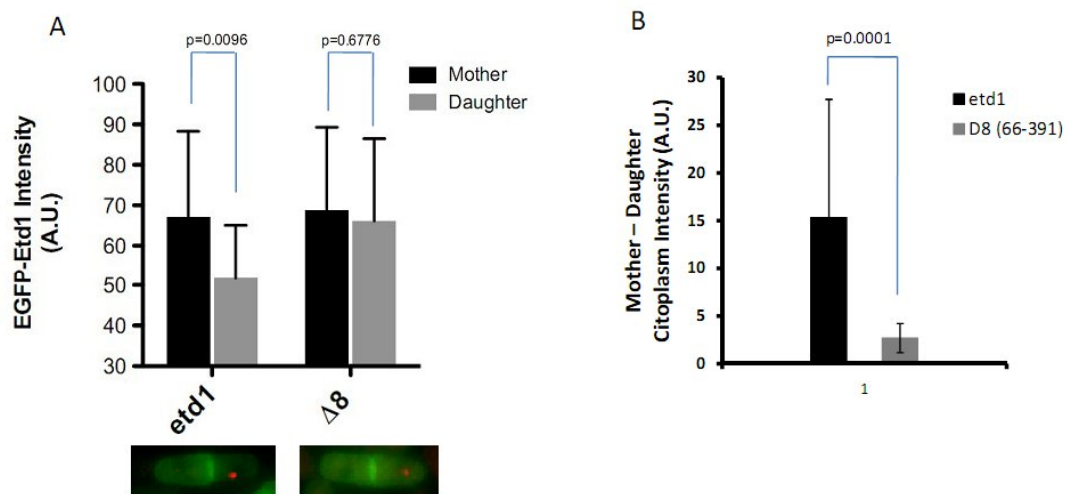


Figura 2.15. El fragmento $\Delta 8$ localiza en la membrana como la proteína completa, pero pierde la asimetría al final de la citocinesis. A) Medida de la intensidad de EGFP-Etd1p en cada uno de los compartimentos del citoplasma (Mother-Daughter) para la proteína completa y el fragmento $\Delta 8$. Según indica el análisis estadístico (T Student) existen diferencias significativas entre los compartimentos de las células que expresan Etd1p, pero no para las que expresan el fragmento $\Delta 8$. B) Comparación de la diferencia de intensidad entre los dos compartimentos del citoplasma al final de citocinesis, entre las células expresando la proteína completa y el fragmento $\Delta 8$. De esta forma las diferencias también son significativas. (n=20)

- Por otro lado, el fragmento $\Delta 10$ pierde su localización en la membrana, pasando a encontrarse en el citoplasma y en el núcleo. En este fragmento la ruta también termina apagándose, aunque más lentamente en algunas células. Esto podría deberse no sólo al cambio de localización, sino también a la mayor expresión de este fragmento en la célula, ya que está descrito que la sobreexpresión de Etd1p interfiere con el apagado de la ruta SIN (Garcia-Cortes and McCollum, 2009).

Por tanto, estos datos sugieren por un lado que la liberación de Etd1p de la membrana puede ser necesaria para activar a Spg1p, pero no determina el momento de su activación, y por otro lado, que la asimetría de Etd1p no es esencial para el apagado de la ruta SIN. Además, la regulación que la ruta ejerce sobre Etd1p para generar su asimetría debe necesitar la proteína completa, incluyendo el extremo N-terminal, ya que si no se pierde la asimetría en la localización de Etd1p.

CAPÍTULO 3

Coordinación de la citocinesis con la ruta SIN.

En la célula, la coordinación de la mitosis con la citocinesis y de ésta con la septación es fundamental para asegurar la formación de dos células hijas idénticas. Esta coordinación debe producirse tanto en el tiempo como en el espacio. El estudio de estos mecanismos es bastante complejo y todavía quedan muchas incógnitas que resolver acerca de la comunicación entre las diferentes rutas de señalización de las células.

En este capítulo se analiza la ruta SIN en más profundidad, intentando entender mejor la relación entre sus componentes y su coordinación con la mitosis y el cierre del anillo durante la citocinesis.

3.1. El cierre del anillo de actinmiosina determina el apagado de la ruta SIN.

La GTPasa Spg1p activa la citocinesis probablemente por activación de la GTPasa Rho1p en el anillo (Jin et al., 2006; Tajadura et al., 2004). Además, anteriormente se ha visto que la GTPasa Rho1p también puede activar a Spg1p en ausencia de Etd1p, lo que demuestra la existencia de una comunicación recíproca entre estas dos GTPasas. Este diálogo podría servir para establecer un bucle de coordinación entre la citocinesis y la actividad SIN, garantizando que SIN permanezca activo mientras el anillo está contrayéndose. Como se muestra en la Figura 3.1, existe una correlación entre ambas actividades. Cuantificando la actividad SIN mediante la intensidad de fluorescencia de Cdc7-Tom en el SPB, y la actividad de constricción mediante el diámetro del anillo establecido por el marcador Rlc1-GFP, se observa que el anillo se ensambla con la activación del nuevo SPB, lo que coincide con el inicio de la mitosis. Cuando este SPB alcanza su máxima actividad, se inicia la contracción del anillo, y esta actividad va decreciendo linealmente conforme el anillo se va cerrando, hasta que con la conclusión de la citocinesis el SPB se inactiva (Garcia-Cortes and McCollum, 2009).

Para demostrar la existencia de una comunicación entre el anillo y la actividad SIN, se modificó la tasa de contracción del anillo, y se analizó su efecto en la actividad de Spg1p. Para ello, como primera aproximación, se utilizó el mutante *hob3Δ* que presenta un retraso de unos 20 minutos con respecto al silvestre en el cierre del anillo de actinmiosina (Coll et al., 2007).

Como se observa en la Figura 3.1, la cinética de inactivación de la ruta SIN sufre una ralentización proporcional a la que muestra la tasa de contracción del anillo en este mutante. Esto demuestra que el anillo comunica su actividad a la ruta SIN, indicando que existe un bucle de retroalimentación entre estos dos procesos.

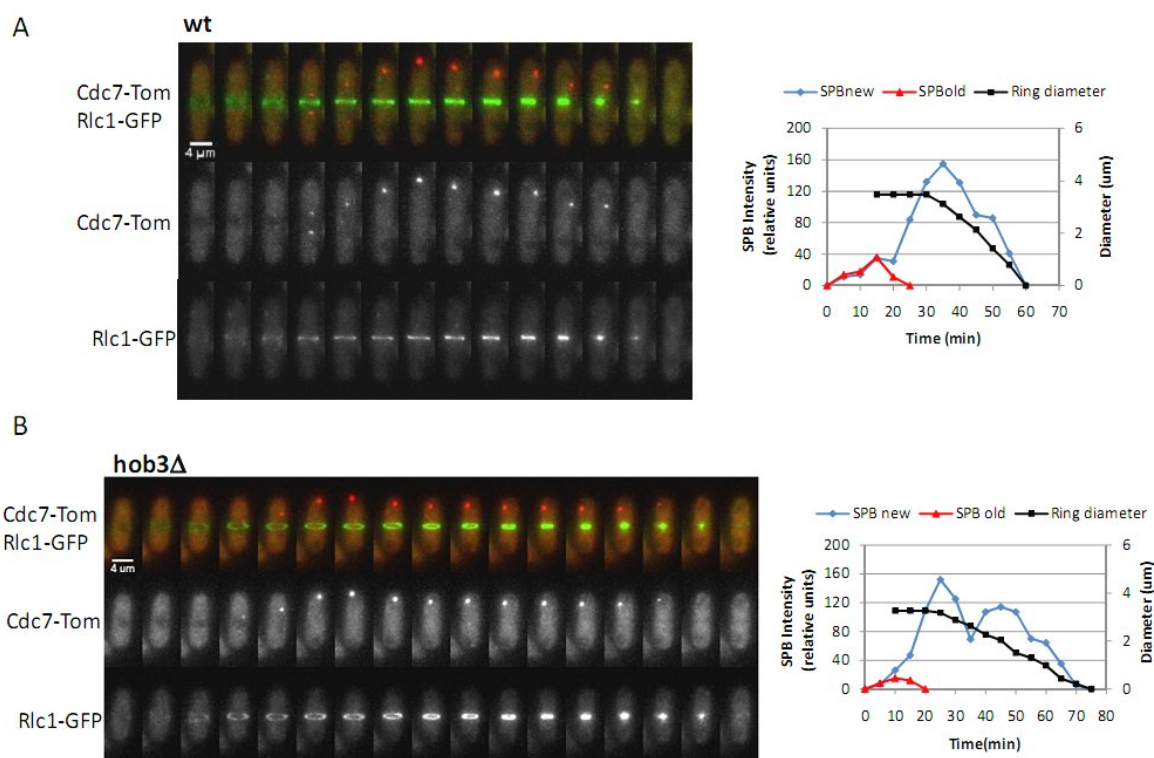


Figura 3.1. El apagado de la ruta SIN está controlado por el cierre del anillo de actinmiosina. Proyección máxima (14 planos de 0,5 μM) de la localización de Cdc7p-Tom y Rlc1p-GFP, a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. El experimento se realizó a 25°C tanto para el silvestre (A) como para el mutante *hob3Δ* (B). Se representa la intensidad relativa de la fluorescencia en los SPBs y el diámetro del anillo.

La β -1,3-glucan-sintasa es un complejo proteico formado por varias subunidades. De éstas, solo la proteína Drc1p/Cps1p/Bgs1p es esencial para la citocinesis (Liu et al., 1999). El mutante *drc1-191* es un mutante termosensible, capaz de ensamblar el anillo de actinmiosina, pero incapaz de contraerlo. Por tanto, este mutante a temperatura restrictiva (37°C) se bloquea con un anillo estable. Tras analizar la actividad de la ruta SIN y la contracción del anillo en este mutante, se comprobó, en consonancia con la hipótesis anterior, que Cdc7p permanece en el SPB mientras el anillo está ensamblado (Figura 3.2).

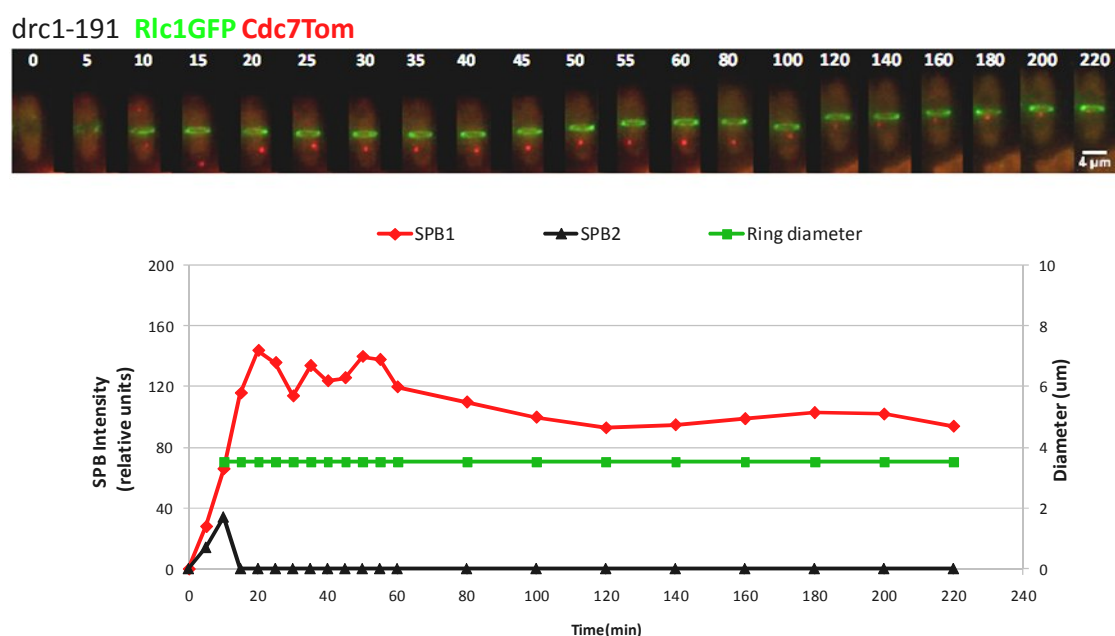


Figura 3.2. La ruta SIN no se apaga si no hay contracción del anillo de actinmiosina. Proyección máxima (14 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc7p-Tom y Rlc1p-GFP, a lo largo del tiempo cada 5 minutos. El experimento se realizó a 37°C (temperatura restrictiva para el mutante). Se representa la intensidad de la fluorescencia en los SPBs y el diámetro del anillo.

Por lo tanto, estos datos sugieren que existe un dialogo cruzado entre las GTPasas Spg1p y Rho1p, que posiblemente sirva para establecer una coordinación entre la actividad SIN y el proceso de contracción del anillo. Etd1p es esencial en la regulación de ambas GTPasas, y en la transmisión de la señal de Spg1p a Rho1p a través de la quinasa Sid2p, por lo que este regulador juega un papel esencial en la coordinación de la mitosis, el crecimiento y la citocinesis.

3.2. Etd1p impide la unión de Cdc16p-Byr4p en uno de los SPBs

Al igual que los centrosomas de vertebrados, el SPB en *S. pombe* reside la mayor parte de interfase en el citoplasma, junto a la envuelta nuclear. Durante la fase G2 del ciclo celular, el SPB se duplica en el citoplasma y en cuanto la célula entra en mitosis, la envuelta nuclear se invagina rodeando a los SPBs. Es en este momento cuando los SPBs se encargan de organizar los microtúbulos que van a formar el huso mitótico (mitotic spindle), para el correcto reparto de los cromosomas. Durante anafase, los SPBs vuelven a ser expulsados al citoplasma (Ding et al., 1997) y es entonces cuando la ruta SIN comienza a ser asimétrica.

Para estudiar con más detalle esta transición, se analizó cómo se comporta Cdc7p durante este periodo. Para ello se empleó la proteína Cut11p como marcador. Esta proteína localiza en la envuelta nuclear y en los poros nucleares y aparece en los SPBs durante mitosis (West et al., 1998), cuando éstos están anclados en la envuelta nuclear (Ding et al., 1997). Cuando los SPBs salen al citoplasma, Cut11p vuelve a localizarse únicamente en la membrana.

Por lo tanto, analizando la localización de Cdc7p y Cut11p a lo largo del ciclo mediante microscopía (Figura 3.3) se observó que Cut 11p desaparece de los SPBs cuando éstos salen de la envuelta nuclear y es aquí cuando comienza la asimetría en la localización de Cdc7p. En este momento sería cuando Etd1p empezaría a formar parte de la ruta SIN, ya que ahora tendría acceso a los SPBs. La activación inicial de la ruta, con los SPBs dentro de la envuelta nuclear, se llevaría a cabo por la proteína Plo1p mediante la inhibición por fosforilación de Byr4p (Ohkura et al., 1995; Tanaka et al., 2001).

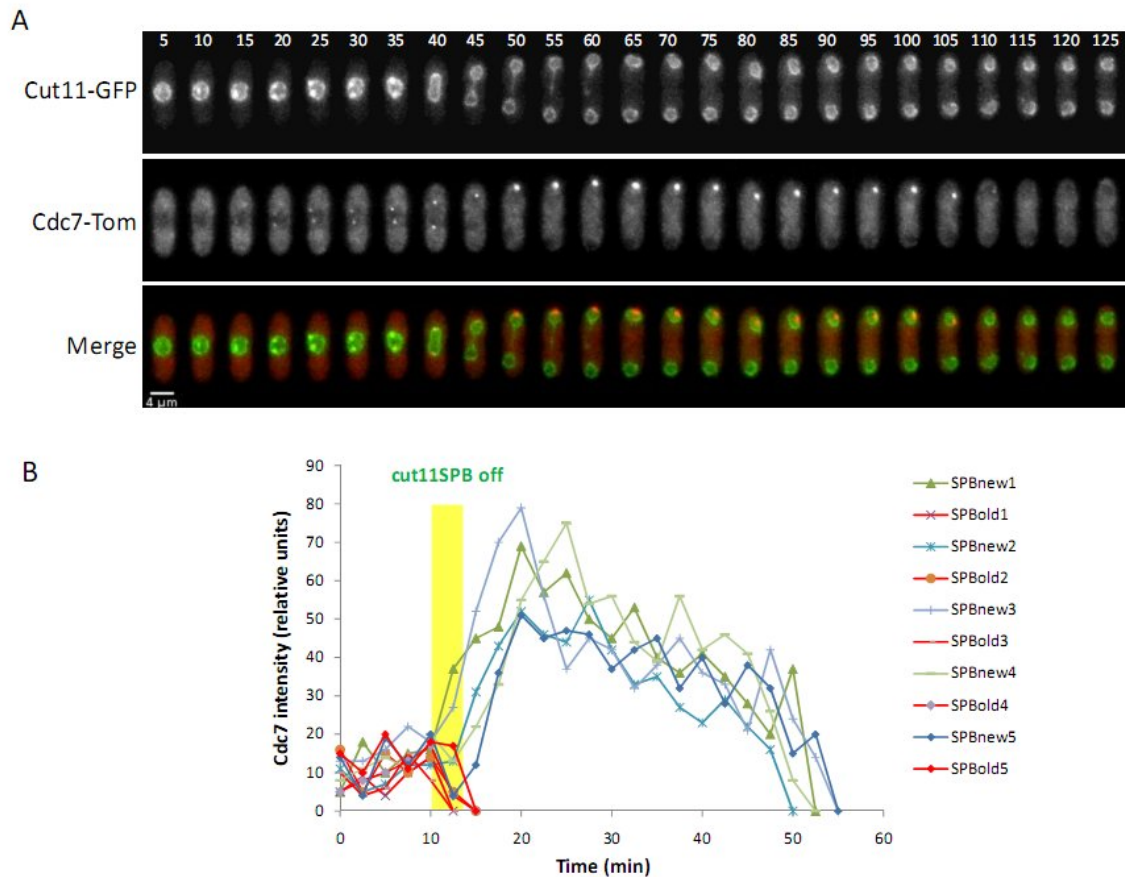


Figura 3.3. Cdc7p se vuelve asimétrico cuando los SPBs salen de la envuelta nuclear. A) Proyección máxima (10 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cut11p-GFP, Cdc7p-Tom y la colocalización de los dos, a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. B) La intensidad de la fluorescencia de Cdc7p-Tom fue cuantificada (unidades arbitrarias) y representada para cada SPB. Se indica también en la gráfica el punto donde Cut11p ya no se observa en los SPBs.

Como ya se ha visto, Etd1p es un componente esencial de la ruta SIN (Daga et al., 2005) y funciona como un regulador positivo de Spg1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Además, se ha propuesto que Etd1p podría ser un homólogo funcional de la proteína de *S. cerevisiae*, Lte1p, ya que ambos son esenciales para la citocinesis sólo a baja temperatura, y en ausencia de ambas proteínas no se activan ni Spg1p ni Tem1p respectivamente (GTPasas de las rutas SIN y MEN) (Daga et al., 2005; Garcia-Cortes and McCollum, 2009).

Históricamente se había propuesto que Lte1p podría funcionar como un GEF de Tem1p (Keng et al., 1994; Shirayama et al., 1994), ya que presenta homología con un GEF de la Ras-GTPasa, Cdc25p. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que Lte1p no tiene actividad GEF in vitro y que su función es principalmente controlar la localización de diferentes componentes de la ruta MEN como Bfa1p (GAP de Tem1p) en los SPBs (Geymonat et al., 2009) o la proteína quinasa Kin4p (Bertazzi et al., 2011; Falk et al., 2011).

En *S. pombe*, el complejo Cdc16p-Byr4p actúa como GAP de Spg1p. Cdc16p presenta la actividad GAP, manteniendo a Spg1p en su estado GDP, pero para realizar su función requiere la presencia de Byr4p que actúa como andamio (scaffold) (Fankhauser and Simanis, 1993; Furge et al., 1998; Song et al., 1996). Si el complejo Cdc16p-Byr4 está presente, Spg1p se encuentra en su estado inactivo con lo que no se une Cdc7p. (Figura 3.4)

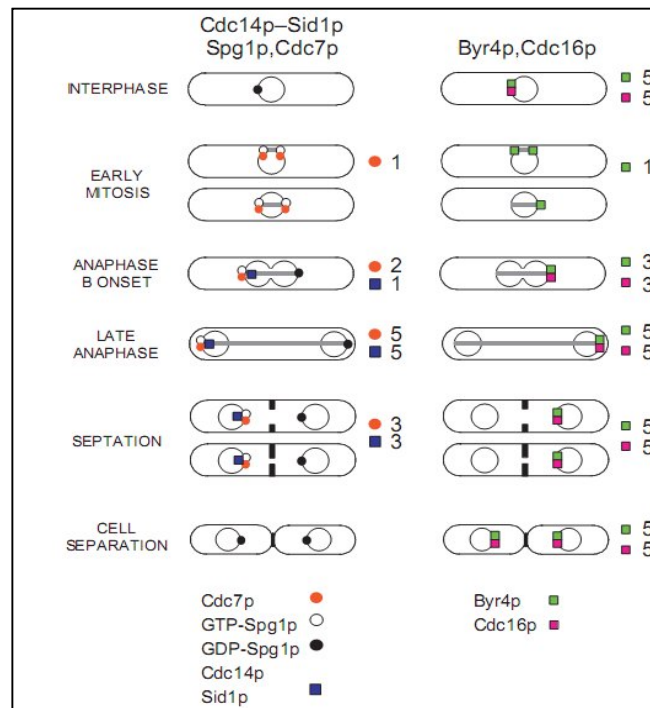


Figura 3.4. Localización de algunos componentes de SIN. Cdc7p se localiza en el SPB cuando Cdc16p no está presente (Simanis, 2003).

Como hasta el momento no se ha demostrado que Etd1p presente actividad GEF, se planteó la posibilidad de que la activación de la ruta por parte de Etd1p se deba también a una competencia con los GAPs, como ocurre en *S. cerevisiae*, en lugar de a una activación directa. Por tanto, se analizó la localización de estos GAPs en ausencia de Etd1p. Para ello, se empleó como marcador la proteína Cdc16p-GFP ya que su localización es totalmente opuesta a la de Cdc7p y además es Cdc16p quien presenta la actividad GAP. Como se puede ver en la Figura 3.5, Cdc16p aparece en el SPB antes de la duplicación y luego desaparece hasta la salida de anafase donde reaparece solamente en uno de los SPBs (SPB madre) (Cerutti and Simanis, 1999). Sin embargo, en ausencia de Etd1p, Cdc16p aparece después de anafase en los dos SPBs. Por lo tanto, Etd1p podría estar compitiendo con Cdc16p por el SPB hijo. Esta competencia podría realizarse directamente, aunque dado que la asimetría de Cdc7p se mantiene en ausencia de Etd1p mediante la sobreexpresión de Rho1p, esta competencia podría ejercerse, directa o indirectamente, a través de su papel activador de Rho1p.

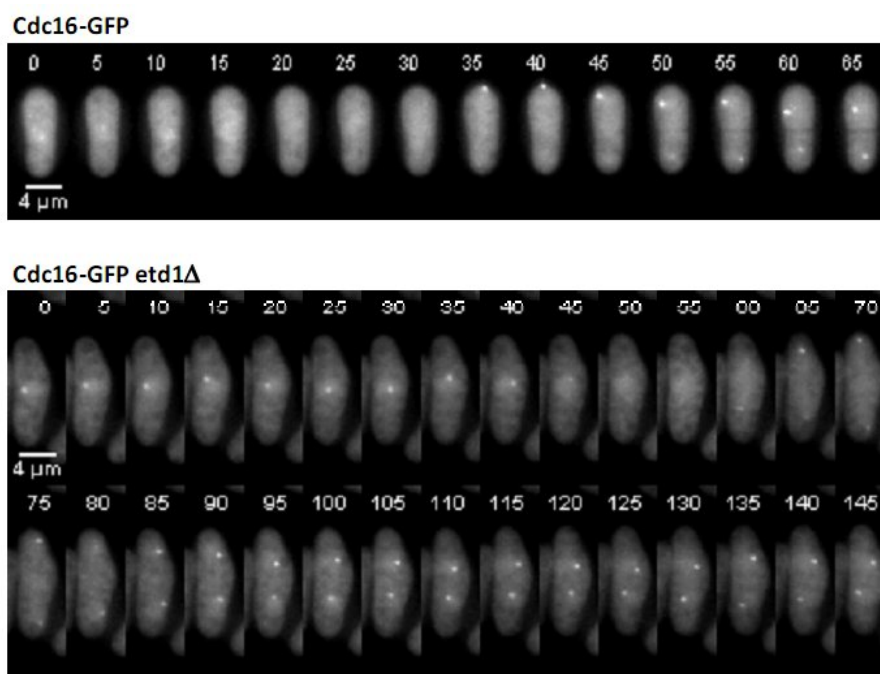


Figura 3.5. En ausencia de Etd1p, Cdc16p localiza en los dos SPBs. A) Proyección máxima (10 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc16p-GFP, a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos.

3.3. Pérdida de la asimetría de Cdc7p en ausencia de la actividad quinasa de Sid2p

Como ya se ha visto y estaba descrito, en ausencia de Etd1p, Cdc7p desaparece de los 2 SPBs durante anafase, cuando éstos salen de la envuelta nuclear (Daga et al., 2005; Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Por tanto, Etd1p es esencial para la activación asimétrica de Spg1p. Hemos visto ya que Rho1p puede por sí mismo realizar esa activación en ausencia de Etd1p, por lo que aunque esta proteína se ha descrito como un activador directo de Spg1p, no podemos descartar que esta activación también la realice Etd1p a través de su papel activador de Rho1p descrito en esta tesis.

La activación de Rho1p requiere la acción del complejo quinasa Sid2p-Mob1p, un paso en el que Etd1p es esencial (ver en Figura 1.8). Por tanto, para entender mejor el papel que juegan Etd1p y Rho1p en la regulación de Spg1p, se estudió el efecto de esta regulación en mutantes afectados en la actividad de Sid2p. Para ello, se analizó la localización de Cdc7p-Tomato en el mutante termosensible *sid2-250*, a 25°C (control) y a 37°C (temperatura restrictiva a la que Sid2 no presenta actividad quinasa).

En la Figura 3.6 se puede observar que mientras que a 25°C la localización de Cdc7p en *sid2-250* es como la de un silvestre, a 37°C, cuando la actividad quinasa de Sid2p decae, Cdc7p pierde la asimetría, encontrándose ahora en los dos SPBs durante más tiempo.

Este dato sugiere que Sid2p, quinasa que según está descrito trabaja al final de la ruta SIN (Hou et al., 2000; Salimova et al., 2000; Sparks et al., 1999), de alguna manera está controlando a Spg1p al comienzo de la ruta, lo que incluiría a esta quinasa en el bucle de retroalimentación descrito para Rho1p y Spg1p. En particular, estos datos indican que Sid2 necesita estar activo para generar una correcta asimetría.

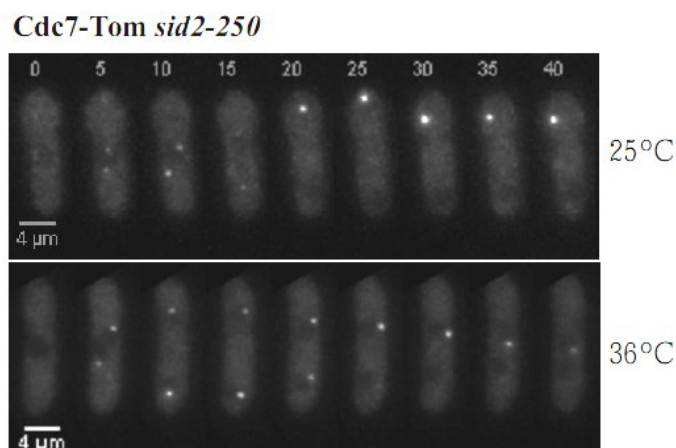


Figura 3.6. En ausencia de actividad quinasa de Sid2p, Cdc7p localiza en los dos SPBs. Proyección máxima (10 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc7p-Tom, a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. El experimento se realizó a 25°C (temperatura permisiva) y a 37°C (temperatura restrictiva).

Por lo tanto, si la falta de Etd1p deslocaliza a Cdc7p de los SPBs y la falta de actividad de Sid2p mantiene a Cdc7p en los dos, y la activación de Rho1p recupera la asimetría en condiciones donde ni Etd1p ni Sid2p están activos (Figura 1.12), esto indica que la asimetría depende de la actividad de Rho1p regulada por Etd1p y Sid2p. Para analizar mejor el papel de estos dos reguladores en la activación asimétrica de Spg1p, es importante analizar el efecto en un doble mutante para ambas proteínas. El problema que se planteaba es que el mutante *etd1Δ* solo crece por encima de 37°C y *sid2-250* es termosensible. Además, el análisis a altas temperaturas puede verse distorsionado por el efecto del estrés térmico. Para evitar estos problemas, abordamos la construcción de un alelo *sid2-as* (“analogue-sensitive” mutant), sensible a un compuesto químico específico a cualquier temperatura (Bishop et al., 2000).

3.3.1. Construcción y caracterización del mutante *sid2-as*

Los mutantes de quinasas sensibles a compuestos químicos fueron descritos por primera vez en el año 2000 por Bishop et al., y en el 2007 se publicó el protocolo para la construcción de estos mutantes en *S.pombe* (Gegan et al., 2007). Este protocolo se basa en mutar un solo residuo de la zona de unión a ATP de la proteína quinasa, lo que le confiere sensibilidad a un compuesto inhibidor.

Además, este inhibidor solamente puede unirse a estos mutantes quinasa y no a otras quinasas silvestres.

Para la construcción del mutante *sid2-as*, se sustituyó la metionina M285 por Glicina y se integró esta mutación en el propio promotor de *sid2* (ver Material y Métodos). Una vez que tuvimos la mutación integrada, se comprobó que efectivamente presentaba sensibilidad. Para esto se utilizó como análogo el compuesto 1-NM-PP1 (1-(1,1-dimethylethyl)-3-(1-naphthalenylmethyl)-1H-pyrazolo [3,4-d]pyrimidin-4-amine) disuelto en DMSO y se ensayaron diferentes concentraciones.

Como se observa en la Figura 3.7, la cepa *sid2-as* resultó ser sensible a 10 μ M de 1NM-PP1 a 25°C tanto en un ensayo de gota como en una curva de crecimiento en estas mismas condiciones. En ambos casos, mientras el silvestre no se ve afectado por la droga, el mutante *sid2-as* no es capaz de crecer a esta concentración del análogo.

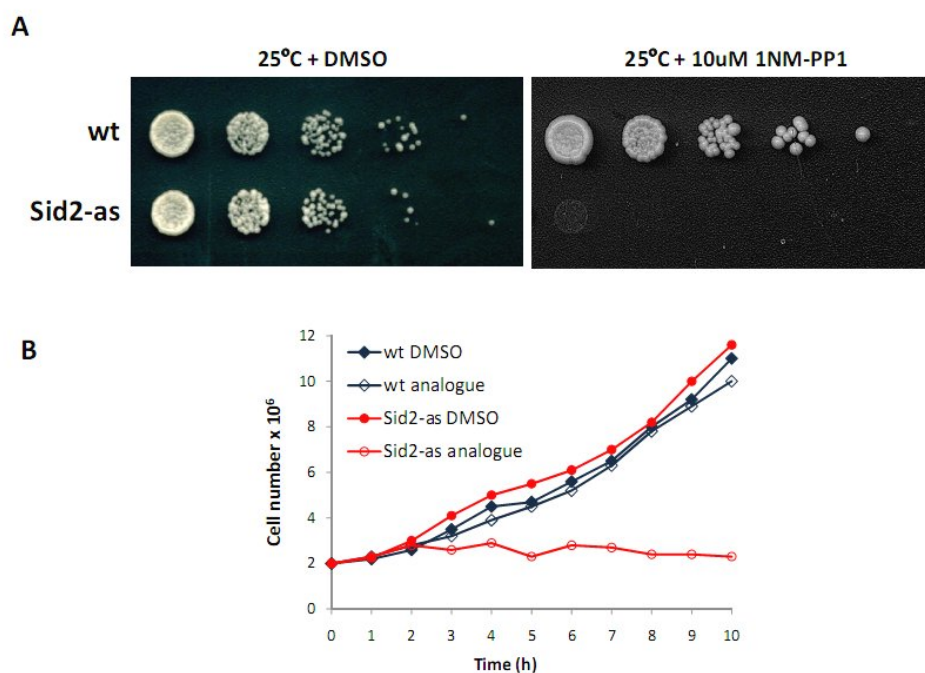


Figura 3.7. El mutante *sid2-as* es sensible al análogo 1NM-PP1. A) Ensayo de gota realizado a 25°C en placas de YES suplementadas con 10 μ M de 1NM-PP1 o el mismo volumen de DMSO como control. B) Curva de crecimiento del silvestre y el mutante *sid2-as* en YES con 10mM de 1NM-PP1 o el mismo volumen de DMSO a 25°C. El número de células se midió cada hora durante 10 horas.

Mediante una tinción de DAPI-Calcoflúor se comprobó que en presencia de 10 μ M de análogo las células *sid2-as* separan los núcleos pero no son capaces de septar, presentando un fenotipo SIN⁻ convencional de células alargadas y multinucleadas (Figura 3.8)

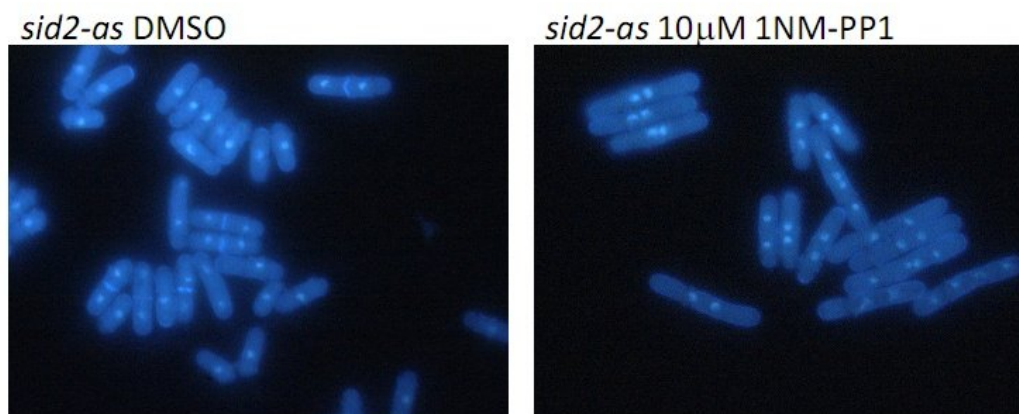


Figura 3.8. El mutante *sid2-as* no es capaz de septar en presencia del análogo. Las células se crecieron a 25°C en presencia de 10 μ M del análogo o DMSO (control). Se fijaron tras 6 de incubación con el análogo y se tiñeron con DAPI-Calcoflúor para observar el fenotipo.

Tras observar que el fenotipo del mutante en presencia del análogo era el mismo que presentaba el mutante termosensible a temperatura restrictiva, se analizó en esta cepa a 25°C la localización de Cdc7p en presencia del análogo. Como ocurría con el mutante termosensible, la falta de actividad quinasa de Sid2p hace que Cdc7p se mantenga unido a los dos SPBs, perdiéndose la asimetría (Figura 3.9).

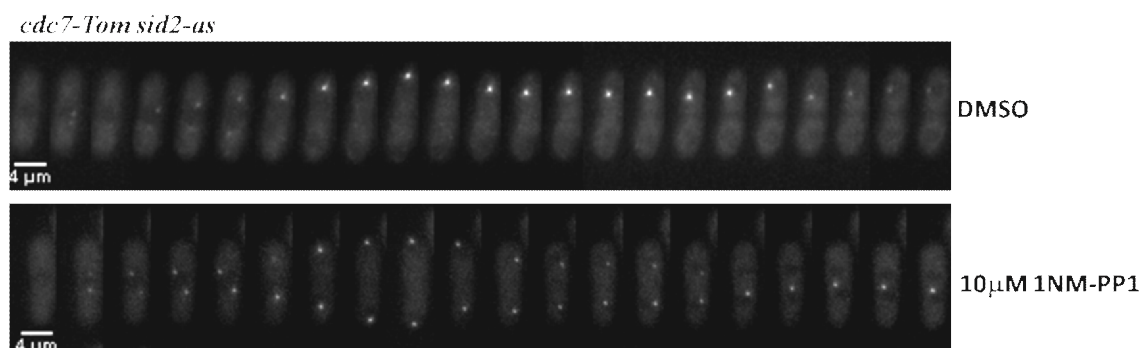


Figura 3.9. La inactivación de *sid2-as* en presencia del análogo localiza a Cdc7p en los dos SPBs. Proyección máxima (14 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc7p-Tom, a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. El experimento se realizó a 25°C con DMSO (control) y con 10 μ M de 1NM-PP1.

Analizando simultáneamente la localización de Cdc16p-GFP y Cdc7p-Tomato en la cepa *sid2-as* en presencia del análogo, se observó que efectivamente, mientras Cdc7p se mantiene encendido en los 2 SPBs, Cdc16p no se localiza en ninguno (Figura 3.10). Este dato indica que Sid2p podría estar controlando la localización de los GAPs, al igual que ocurre con Etd1p. Por tanto, Sid2p debe estar implicado en el control de la asimetría de Spg1p, directa o indirectamente, en el sistema de retroalimentación descrito para Rho1p.

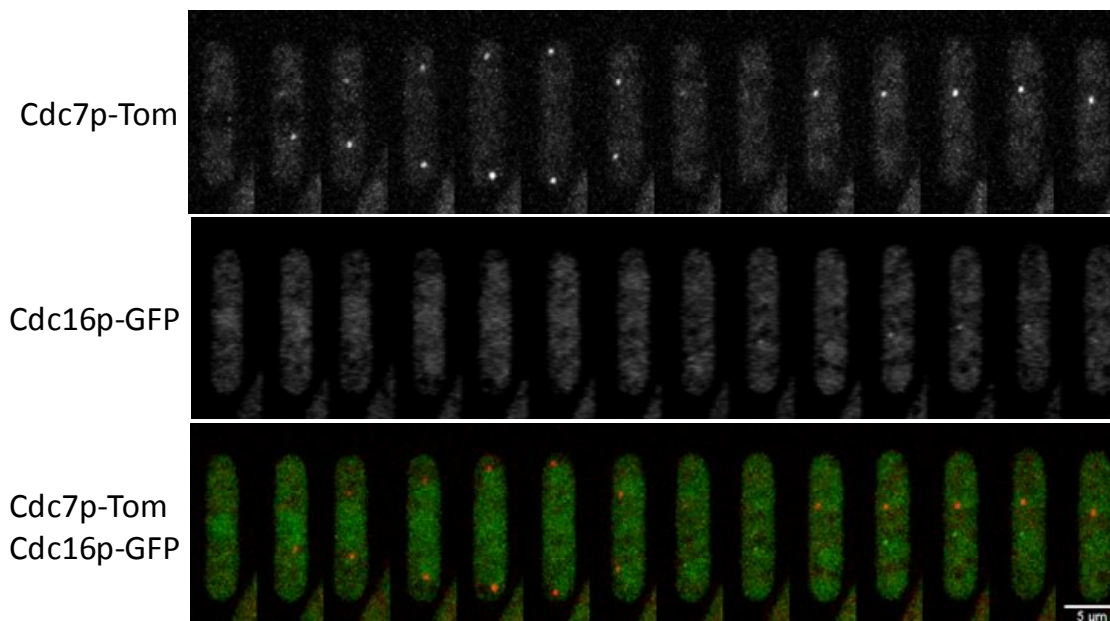


Figura 3.10. La falta de actividad de Sid2p altera la localización de Cdc7p y Cdc16 en los SPBs. Proyección máxima (14 planos de 0,5 μ M) de la localización de Cdc7p-Tom y Cdc16p-GFP, a lo largo del tiempo en intervalos cada 5 minutos. El experimento se realizó a 25°C y con 10 μ M de 1NM-PP1.

3.4. Intercomunicación entre los SPBs

Claramente, Rho1p y sus reguladores Etd1p y Sid2p participan de una forma u otra en la activación de Spg1p mediante el establecimiento de una asimetría en los dos SPBs. Para esto, es necesaria la existencia de una dinámica molecular que transmita señales entre el anillo medio y el SPB, y entre ambos SPBs. De estos tres elementos claves en el bucle de retroalimentación y asimetría,

ni Etd1p, ni Rho1p han podido localizarse en los SPBs, y sólo Sid2p puede encontrarse en ambas estructuras.

Sid2p es una proteína quinasa que se localiza en los dos SPBs durante todo el ciclo y al final de anafase aparece también en la zona del anillo (Hou et al., 2000; Salimova et al., 2000; Sparks et al., 1999). Por esta razón, se planteó la posibilidad de que la localización de Sid2p en estas estructuras fuera dinámica, estableciendo una vía de intercomunicación entre el anillo y los SPBs.

El reciente descubrimiento de proteínas fluorescentes fotoactivables y fotoconvertibles ha hecho posible estudiar la dinámica de diferentes proteínas dentro de las células (Lippincott-Schwartz and Patterson, 2008). Por tanto, para probar esta hipótesis, se construyó una cepa de Sid2p marcada con una GFP fotoconvertible. Para esto clonamos el gen de *sid2* en el plásmido pREP42-EGFP(Dendra)3x (Chudakov et al., 2007).

Para analizar la dinámica de Sid2p, usando este sistema, se visualizó la proteína excitando con el láser correspondiente a la GFP (λ 491); se fotoactivó la estructura seleccionada con un láser de longitud de onda 405 y se observó la proteína fotoconvertida en rojo (λ 561).

Podemos distinguir varios casos:

- Fotoactivación de uno de los SPBs en células sin anillo. En la Figura 3.11 A se puede observar que cuando se fotoactiva uno de los SPBs, la señal en el canal rojo aparece en los dos, lo que significa que existe intercambio de proteína Sid2p entre los SPBs.
- Fotoactivación del Sid2p del anillo. Como se ve en la Figura 3.11 B, al fotoactivar el anillo, la proteína roja se ve también en los SPBs, lo que indica que se produce intercambio de proteína desde el anillo a los SPBs.
- Fotoactivación de uno de los SPBs en células con anillo. Como puede observarse en la Figura 3.11 C, la proteína fotoactivada en el SPB aparece también en el anillo, señalando la existencia de comunicación del Sid2p del SPB al anillo.

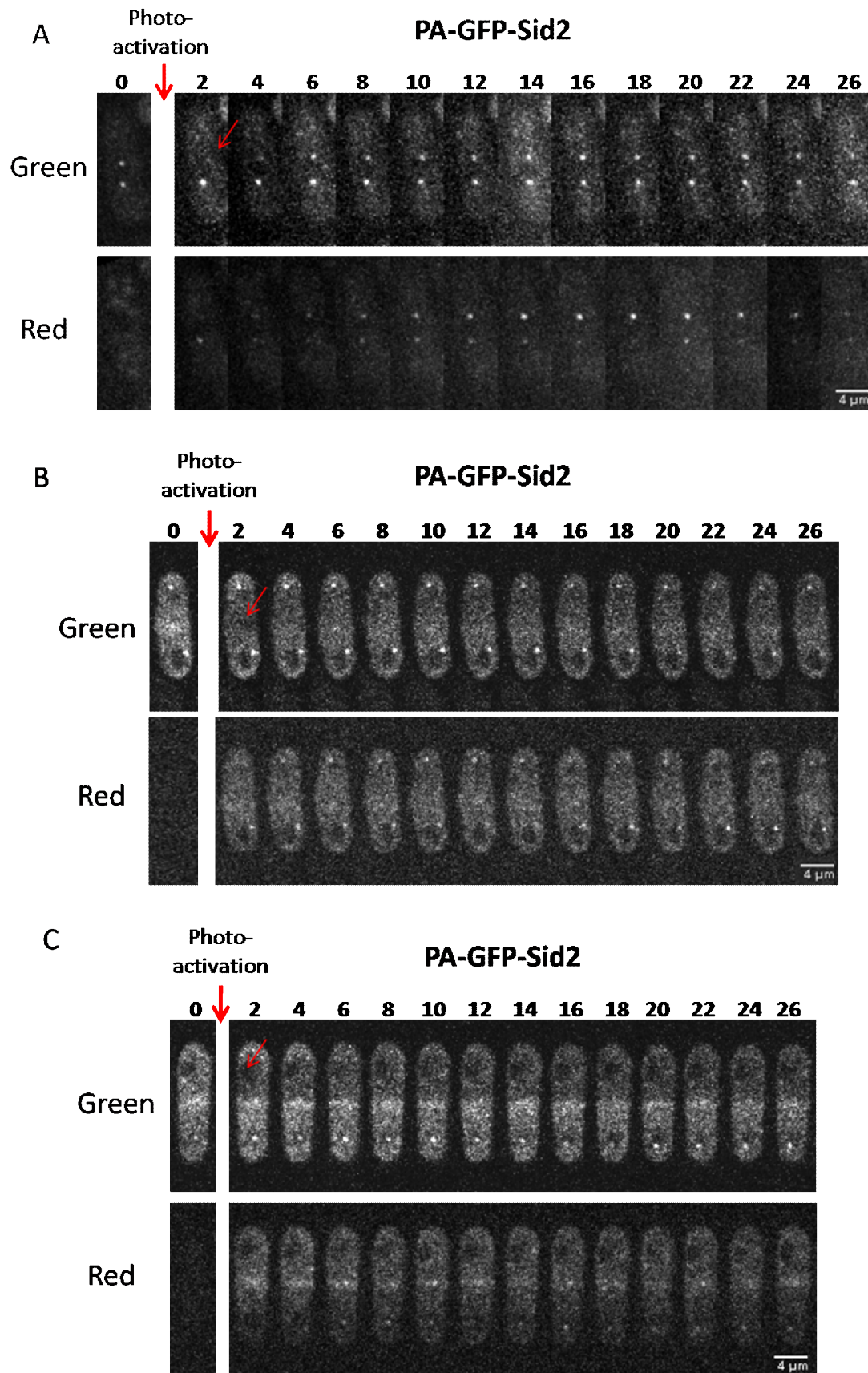


Figura 3.11. Existe intercambio de Sid2p entre los SPBs y el anillo. Localización de Sid2-GFP(Dendra) a 491nm (verde) y a 561nm (rojo) cada 2 segundos. Las flechas rojas indican el momento y el lugar donde se realizó la fotoactivación.

DISCUSIÓN

1. Etd1p como nuevo activador de Rho1p

El papel de Etd1p en la ruta de septación (SIN) ha sido muy discutido en los últimos tiempos. La función de Etd1p como activador positivo de SIN se describió gracias al hecho de que en ausencia de la actividad de esta proteína, las células no son capaces de hacer citocinesis y además, la GTPasa Spg1p no se encuentra activa (Daga et al., 2005; Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Recientemente se ha demostrado que Etd1p activa la ruta SIN a través de la GTPasa Spg1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Sin embargo, se ha visto que la función de Etd1p también se requiere para mantener la integridad de la pared celular. Esto, junto con la localización de Etd1p en las puntas de la célula durante interfase y en la zona media en citocinesis hace pensar que esta proteína tiene un papel que va más allá de la simple activación de la ruta SIN.

Rho1p es una GTPasa universalmente conservada y en *Schizosaccharomyces pombe* ejerce un papel esencial en la regulación de la síntesis de la pared celular y la formación del septo (Arellano et al., 1996). Como hemos visto, la sobreexpresión de Rho1p rescata los defectos de pared y de formación del septo que presenta la falta de función de Etd1p (Figura 1.6), lo que hace pensar que Rho1p podría estar de alguna manera regulada por Etd1p. Además, la falta de función de los inhibidores de Rho1p, Rga1p and Rga5p, así como la sobreexpresión de alguno de sus activadores, Rgf1p y Rgf3p, también rescatan a este mutante. Por el contrario, ni la delección de *rga8* ni la sobreexpresión de Rgf2p, tienen un efecto positivo en la delección de *etd1*, lo que indica que la supresión de los defectos de la falta de función de Etd1p se debe a una mayor actividad de Rho1p pero a través de reguladores específicos.

Frecuentemente, la localización de las proteínas en las células está relacionada con su función. Los reguladores de Rho1p localizan al igual que esta GTPasa en las puntas de la célula y/o en el septo (Arellano et al., 1996; Mutoh et al., 2005; Nakano et al., 2001; Tajadura et al., 2004). De todos los componentes conocidos de SIN, Etd1p es el único que localiza en las puntas y en el septo, coincidiendo con Rho1p y con sus reguladores. Así, tanto las interacciones

genéticas como la localización celular de estas proteínas, apuntan a que Etd1p podría estar implicada en la activación de Rho1p para regular la síntesis de pared celular durante el crecimiento y la septación.

Los ensayos de co-inmunoprecipitación indican que Etd1p interacciona con Rho1p, lo que unido al hecho de que los niveles de Etd1p regulan los de Rho1p-GTP (forma activa de la proteína) y los correspondientes a la actividad 1,3- β -glucan sintasa, apuntan a que Etd1p podría ser un nuevo activador de Rho1p implicado en la síntesis de pared celular y septo. Los activadores de GTPasas mejor caracterizados son los GEFs, sin embargo, a pesar de esta regulación positiva, Etd1p no presenta en su estructura ningún motivo RhoGEF bien definido, por lo que el mecanismo molecular por el cual Etd1p estaría activando a Rho1p no está aún claro.

Aunque se sabe que Etd1p activa a Spg1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009), el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta activación también sigue aún sin resolverse. Se ha propuesto que Etd1p presenta una ligera similaridad de secuencia con el dominio GEF CHD de los ortólogos de Lte1p de *S. cerevisiae* y que esta similaridad sugiere que estas dos proteínas podrían ser homólogas (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Durante mucho tiempo se consideró que Lte1p podría estar funcionando como un GEF de la GTPasa Tem1p (Keng et al., 1994; Shirayama et al., 1994), ya que esta proteína presentaba homología con la proteína Cdc25p, un GEF de las Ras-GTPasas en *S. cerevisiae*. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que Lte1p no tiene actividad GEF in vitro, sino que controla la localización de diferentes reguladores de la ruta MEN (Mitotic Exit Network) como del GAP Bfa1p en los SPBs (Geymonat et al., 2009), o de la proteína quinasa Kin4p (Bertazzi et al., 2011; Falk et al., 2011). Según nuestros resultados, la delección de *rga1* o *rga5* (GAPs de Rho1p) rescatan al mutante *etd1* y como se ha visto, Etd1p es necesario para que el complejo quinasa Sid2p-Mob1p se relocalice en la zona del anillo (Figuras 1.4 y 1.11). Por lo tanto, al igual que se ha propuesto para Lte1p, Etd1p podría estar implicado en el control de los reguladores de la GTPasa Rho1p, Rga1p/Rga5p y Sid2p-Mob1p. Además, Etd1p participa en la localización del GAP de Spg1p, Cdc16p (Figura 3.5), por lo que también podría estar regulando a esta GTPasa a través de su regulador. Paralelamente, Lte1 también

parece regular Tem1p a la vez que otras GTPasas del córtex celular (Geymonat et al., 2010).

2. Inhibición de Rho1p por PP2A-Pab1p

La proteína fosfatasa PP2A es un heterodímero formado por una subunidad catalítica (C), una estructural (A) y una o varias subunidades reguladoras (B, B') (Mayer-Jaekel and Hemmings, 1994). Estudios previos han demostrado que las subunidades B' de *S. pombe*, Par1p y Par2p, participan en la regulación de la ruta SIN (Jiang and Hallberg, 2001; Le Goff et al., 2001). Par1p es un inhibidor de la ruta SIN que desfosforila Cdc11p al final de mitosis (Krapp et al., 2003). Por otro lado, la subunidad reguladora B, Pab1p también está implicada en la regulación de SIN a diferentes niveles. La falta de función de Pab1p activa la ruta SIN en ausencia de Etd1p (Lahoz et al., 2010), sin embargo, en este doble mutante el complejo Sid2p-Mob1p no es capaz de relocalizarse en el anillo ni de recuperar su actividad, lo que indicaría que Pab1p también está actuando por debajo de la ruta SIN. De hecho, la sobreexpresión de esta subunidad de la fosfatasa disminuye los niveles de Rho1p activo, por lo que PP2A-Pab1p podría estar regulando negativamente a esta GTPasa.

En células animales se ha sugerido que el GAP de RhoA, p190, y el GEF Ect2p trabajan antagonísticamente regulando la actividad de RhoA (Rho1p en *S. pombe*) durante citocinesis (Mikawa et al., 2008). Se sabe que este GAP está activo cuando se encuentra desfosforilado y esta desfosforilación es llevada a cabo por la proteína fosfatasa PP2A (Mori et al., 2009). Recientemente se ha descrito que esto también ocurre en otras células eucariotas (McAvoy et al., 2009; Sopko et al., 2007; Toure et al., 2008; Wolfe et al., 2009; Zheng et al., 2007). Posiblemente en *S. pombe*, la inhibición de Rho1p por PP2A-Pab1p, puede ocurrir indirectamente a través de la defosforilación activadora de alguno de sus GAPs, ya que no se ha encontrado interacción directa entre Pab1p y Rho1p (Lahoz et al., 2010). Además, la supresión de la letalidad de la falta de función de Etd1p por Rga1p y Rga5p (Figura 1.7) y la asociación entre Rga1p y PP2A (datos del laboratorio aún sin publicar), apoyan

esta posibilidad. Por tanto, sería interesante realizar estudios de la fosforilación de estos dos GAPs en presencia y ausencia de PP2A-Pab1p, para comprobar esta hipótesis.

En *S. pombe*, tanto Rho1p como sus reguladores y efectores juegan un papel fundamental en la regulación de la citocinesis. Con los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo podríamos proponer a Etd1p y Pab1p, la subunidad B de la fosfatasa PP2A, como nuevos reguladores de esta GTPasa universalmente conservada.

3. Caracterización de los dominios de Etd1p

Etd1p es una proteína de 391 aminoácidos que no presenta una homología suficientemente significativa con ninguna proteína conocida. Por lo tanto, el estudio de la estructura de esta proteína ha sido fundamental para conocer un poco más acerca de su función. Mediante la construcción de diferentes fragmentos de la proteína, pudimos determinar que el fragmento N-terminal de 66 a 133 aminoácidos de Etd1p, es el responsable de la localización de esta proteína. Este fragmento presenta una pequeña homología, aunque no demasiado significativa, con los GEF de Rho1p, Rgf1p y Rgf2p, aunque esta homología no coincide con el dominio GEF de esta proteína, sino con el dominio CNH (Citron and NIK1-like kinase homology-domain); la función de este dominio no está muy clara, aunque en la mayoría de los casos está implicado en la interacción proteína-proteína (Garcia et al., 2006b). Por lo tanto, podría ser que el anclaje de Etd1p a la membrana se realizara a través de la interacción de este dominio con proteínas de membrana. Otro dominio interesante es el que representan los primeros 66 aminoácidos, que parecen necesarios para la degradación específica de Etd1p en una de las células hijas (Figura 2.15).

Etd1p ha sido propuesto como un regulador del encendido y apagado de SIN por su regulación directa de Spg1p (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). La activación se realizaría por la liberación de esta proteína del córtex al citoplasma, y

la inactivación, por la degradación en una de las células, generando a su vez una situación de asimetría que determina la asimétrica activación de Spg1p en sólo uno de los SPBs. El análisis de los fragmentos ha determinado que en células donde un fragmento de Etd1p funcional, que no se ancla a la membrana o que no genera asimetría, la regulación de Spg1p no se altera significativamente. Es más, la regulación asimétrica de Spg1p puede obtenerse incluso en ausencia de Etd1p, con la activación ectópica de Rho1p. Por lo tanto, esta regulación directa de Spg1p por Etd1p no está aún tan clara.

Mediante esta aproximación, también se determinó el dominio que confiere la capacidad funcional a Etd1p. De todos los fragmentos expresados, sólo aquellos que presentan la región C-Terminal (200-391 aminoácidos) son capaces de complementar la falta de función de la proteína completa y de activar la ruta SIN. Por tanto, podemos concluir que este fragmento es el responsable de la función de la proteína. Ese dominio es precisamente el responsable de la interacción con Rho1p (Figura 2.12), por lo que aunque no existe ninguna pista clara de su actividad por el análisis de secuencias, este dato indica que la activación de Rho1p posiblemente se realice por interacción física.

Estos resultados nos llevan a plantear un posible mecanismo molecular de acción de Etd1p. Esta proteína activa a Rho1p mediante interacción directa. En cuanto que la falta de los inhibidores Rga1p y Rga5p suplen la necesidad de Etd1p, es posible que su función sea la de impedir físicamente la unión de estos inhibidores a Rho1p. Curiosamente, Etd1p presenta una cierta similitud con proteínas GAP (Figura 2.3), lo que permite especular que tanto Etd1p como estos GAPs podrían compartir un sitio de unión a Rho1p, actuando Etd1p a modo de dominante negativo natural. Consecuentemente con esta hipótesis, Etd1p también compite con el GAP de Spg1p, Cdc16p, impidiendo su unión a uno de los SPBs (Figura 3.11)

Etd1p es una proteína que se encuentra regulada a lo largo del ciclo. Esta proteína es degradada tras la septación mediante el proteasoma (Daga et al., 2005). Gracias a los fragmentos, también se observó que cuanto más pequeño es el fragmento C-Terminal, más cantidad de proteína hay en las células. Esto puede deberse a que estamos eliminando dominios necesarios para la degradación de

Etd1p del dominio N-Terminal. Esta mayor concentración de proteína en la célula hace que tras una expresión elevada (por encima de 30 horas), empiecen a aparecer células alargadas y multinucleadas, un fenotipo idéntico al de la falta de función de la proteína o al que se obtiene con la sobreexpresión de Etd1p con un promotor fuerte (nmt3x). Además, la sobreexpresión de estos fragmentos, al contrario de lo que ocurre con la proteína completa, disminuye la cantidad de Rho1p activo. Se ha descrito que el fenotipo SIN⁻ obtenido con altos niveles de expresión de Etd1p se debe a la capacidad de secuestrar a Spg1p del SPB, impidiendo su activación (Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Posiblemente la alta expresión del fragmento $\Delta 10$ puede estar secuestrando también a esta GTPasa. Este secuestro conllevaría a una inactivación de la ruta SIN y, consecuentemente, a la reducción de Rho1p activo. Alternativamente, los altos niveles de expresión de estos fragmentos de Etd1p podrían estar secuestrando a Rho1p de la membrana, impidiendo así su activación.

4. Coordinación entre SIN y citocinesis

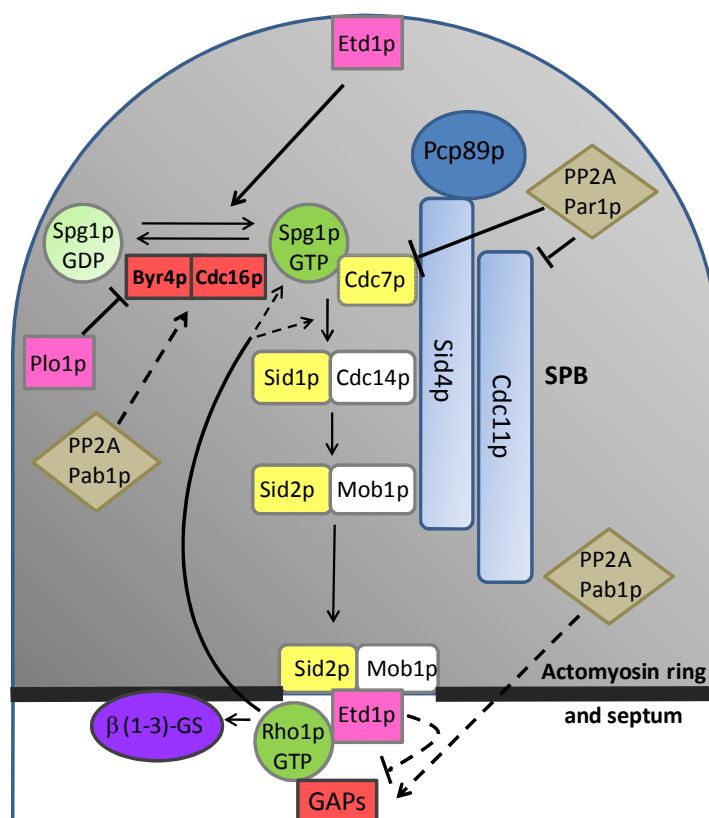
Al final de la anafase B, una vez que los núcleos se han separado completamente, la ruta SIN dispara la contracción del anillo de actinmiosina y la formación del septo. Estos procesos deben estar perfectamente coordinados y la señal que se desencadena en los SPBs debe llegar al anillo a través de Etd1p y el complejo quinasa Sid2p-Mob1p, ya que son los dos únicos componentes de SIN que se localizan en el anillo. El estudio de la actividad SIN en el doble mutante *etd1 Δ pab1-4* reveló que, aunque la señal de Spg1p se recupera en esta cepa, encontrándose la ruta SIN activa y las células son ahora capaces de dividirse, el complejo Sid2p-Mob1p no es capaz de relocalizarse en el anillo ni de recuperar su actividad quinasa. Lo mismo ocurre cuando sobreexpresamos Rho1p en una cepa sin *etd1*. Esto demuestra que existe un mecanismo de activación de la citocinesis que funciona independientemente de SIN. Consecuentemente, en estas células la señal de la ruta SIN y la citocinesis están desacopladas, lo que podría explicar la frecuencia en la aparición de células binucleadas en esta cepa (Lahoz et al., 2010).

Esto indicaría que esta proteína es esencial para coordinar la mitosis y la citocinesis a través de SIN.

La supresión de la letalidad del mutante *etd1Δ* por la hiperactivación de Rho1p, aporta otros datos acerca de esta coordinación. Esta hiperactivación, ya sea directa (pREP41x-Rho1p) o a través de sus reguladores (*pab1-4*, *rga5Δ*), restaura la actividad de Spg1p en células carentes de Etd1p. No podemos descartar la posibilidad de que Pab1p o Rga5p, a la vez que regulan Rho1p, puedan estar actuando directamente sobre Spg1p, sin embargo, la activación de la ruta SIN cuando sobreexpresamos directamente Rho1p, indica que esta GTPasa está controlando la ruta por sí misma. Acorde con este dato, la hiperactivación de Rho1p en un fondo silvestre suele presentar células multiseptadas (Arellano et al., 1996).

Como ya se ha indicado, una buena coordinación entre la mitosis y la citocinesis es esencial para el correcto funcionamiento de las células. Para ello, la coordinación entre la mitosis y la ruta SIN está controlada por varias proteínas. La activación inicial de la ruta (cuando los SPBs están aún dentro de la envuelta nuclear) es llevada a cabo por la quinasa mitótica Plo1p (Ohkura et al., 1995; Tanaka et al., 2001). Hemos visto que cuando los SPBs salen de la envuelta nuclear comienza la asimetría en la localización de Cdc7p. En este momento sería cuando Etd1p empezaría a formar parte de la ruta SIN, ya que ahora tendría acceso a los SPBs. Una vez que la GTPasa Spg1p alcanza su máxima actividad (máxima fluorescencia de Cdc7p en el SPB), se inicia la contracción del anillo de actinmiosina y la formación del septo por parte de la GTPasa Rho1p y la β -1,3 glucan sintasa. Tras este momento, el apagado de la intensidad de Cdc7p en el SPB y la tasa de contracción siguen cinéticas similares y la ruta SIN no se apaga hasta que el anillo se ha cerrado completamente (Daga et al., 2005; Garcia-Cortes and McCollum, 2009). Por tanto, podría existir una retroalimentación positiva de la ruta SIN por algún componente del anillo que asegure que la ruta no se apague hasta que el anillo no se cierre. Acorde a esta posibilidad, un retraso en la tasa de contracción del anillo o un bloqueo de esta contracción tienen un efecto proporcional en el apagado de la ruta. Por tanto, teniendo en cuenta que la activación de Rho1p activa directamente la ruta SIN, esta proteína podría ser la

1. *Journal of the American Medical Association*, 2000; 283: 2689-2694.



5. Establecimiento de la asimetría en los componentes de SIN

La transición desde una distribución simétrica en los componentes de SIN a la generación de asimetría, requiere la inactivación de las CDK mitóticas (Chang et al., 2001; Dischinger et al., 2008; Guertin et al., 2000; He et al., 1997; Yamano et al., 1996). Además, una baja actividad quinasa de Cdc2p permite el reclutamiento de Sid1p por parte de Cdc7p (Guertin et al., 2000; Wheatley et al., 1997).

Pero la determinación inicial de esta asimetría depende principalmente de los GAPs de Spg1p. Aquellas células en las que la actividad GAP está ausente, presentan una simetría en los componentes de SIN durante anafase y la ruta está permanentemente activa presentando las células múltiples septos (Guertin et al., 2000; Minet et al., 1979; Sohrmann et al., 1998; Song et al., 1996). En estas células, Cdc7p, que sólo se une al SPB cuando Spg1p está activo (Sohrmann et al., 1998), se encuentra consecuentemente unido a los dos SPBs.

Aunque bien sabemos que Etd1p es necesaria para la activación y el mantenimiento de la ruta SIN en *S. pombe* (Daga et al., 2005; Garcia-Cortes and McCollum, 2009), el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta activación todavía se desconoce. Se ha propuesto que al igual que la proteína Lte1p de *S. cerevisiae* (Bardin et al., 2000; Keng et al., 1994; Shirayama et al., 1994), Etd1p podría estar actuando como GEF de esta GTPasa, sin embargo, no se ha encontrado actividad GEF *in-vitro* para esta proteína (Garcia-Cortes and McCollum, 2009).

Recientemente, se ha demostrado que en *S. cerevisiae*, Lte1p no contribuye a modificar el estado GDP-GTP de Tem1p, sino que su función principal en la regulación de esta GTPasa es la de controlar la localización de sus GAPs (Geymonat et al., 2010). Igualmente, nuestros resultados indican que Etd1p es necesaria para restringir la localización de los GAPs de Spg1p a un solo SPB. En ausencia de Etd1p, los GAPs se localizan en los 2 SPBs, perdiéndose la asimetría y permaneciendo, por tanto, la ruta inactiva. Una posible hipótesis sería que Etd1p podría estar compitiendo con los GAPs por el SPB hijo. Pero ¿por qué compite solamente un SPB?

Analizando la localización de Cdc7p en diferentes mutantes SIN⁻ se observó que en un mutante termosensible *sid2-250* (última quinasa de la ruta) la asimetría de esta proteína también se perdía a temperatura restrictiva (37°C) y cuando analizamos esta distribución en un mutante *sid2-as* en presencia del análogo, se obtuvo el mismo resultado. Este dato es particularmente interesante, ya que sugiere que Sid2p, quinasa que trabaja al final de la ruta SIN, de alguna manera controla la localización de Cdc7p, una quinasa que funciona al principio de la ruta, estableciéndose un mecanismo de retroalimentación o feedback, similar al propuesto para Rho1p. Una posible hipótesis sería que la quinasa Sid2p puede ser la responsable del establecimiento de una diferencia entre los 2 SPBs, quizás a través de Rho1p, que haga a uno de ellos más afín a la unión del GAP. Esto haría que Etd1p pudiera competir al GAP solamente en uno de los SPBs, pero no en el otro. Los experimentos realizados con Sid2p-GFPDendra confirman que existe comunicación entre las poblaciones de Sid2p de los 2 SPBs y el anillo, lo cual apoyaría esta hipótesis.

La inactivación del GAP Cdc16p produce una hiperactivación de la ruta SIN con múltiples rondas de septación. La atenuación de la actividad de las quinasas de la ruta: Cdc7p, Sid1p y Sid2p rescata parcialmente este fenotipo; esto puede deberse a que estas proteínas trabajan por debajo de Spg1p, como se ha descrito (Balasubramanian et al., 2000) y aunque esta proteína este hiperactivada, al cortar la ruta por debajo, se atenúa esta activación. Sin embargo, se ha propuesto, que otra posible explicación puede ser que alguna de estas proteínas funcione como regulador positivo de Spg1p (Fournier et al., 2001). Este dato también es consecuente con la hipótesis propuesta anteriormente.

RhoA es una de las GTPasas más importantes en el ciclo celular, en cuanto que es la responsable de la citocinesis, último paso de la división, en células eucariontes. El estudio de su equivalente Rho1p en *S. pombe* puede revelar muchos aspectos aún desconocidos de la regulación de estas GTPasas. Etd1p posiblemente identifica un nuevo tipo de regulador de estas proteínas, esencial para la coordinación de la división, el crecimiento y la mitosis. El análisis en esta tesis de los elementos regulados por esta proteína, como son Spg1p, Rho1p y Sid2p, han puesto en evidencia la existencia de un mecanismo de retroalimentación que

coordina estrechamente la actividad SIN con la contracción del anillo. El mecanismo por el que Rho1p puede activar por sí misma a Spg1p de forma asimétrica es una de las nuevas intrigas que esperamos poder desvelar en los próximos años.

CONCLUSIONES

1. La falta de actividad de la subunidad B de la fosfatasa PP2A, Pab1p, suprime los defectos de crecimiento y septación del mutante *etd1*.
2. El complejo fosfatasa PP2A-Pab1p regula negativamente a Spg1p.
3. En ausencia de Etd1p, la falta de actividad del complejo PP2A-Pab1p puede activar la citocinesis directamente por un mecanismo independiente de la ruta de septación.
4. La hiperactivación de Rho1p activa la citocinesis en ausencia de Etd1p, recuperando la actividad de la GTPasa Spg1p.
5. Etd1p y el complejo PP2A-Pab1p actúan antagónicamente sobre la actividad de Rho1p: Etd1p regula positivamente a Rho1p mediante interacción directa, mientras que PP2A-Pab1p actúa como inhibidor, a través de alguno de sus reguladores.
6. El dominio N-terminal (66-133 aminoácidos) de Etd1p determina su localización.
7. El dominio C-terminal de Etd1p determina su actividad molecular.
8. La localización en la membrana de Etd1p no condiciona la activación de la ruta SIN.
9. El cierre del anillo de actinmiosina determina el apagado de la ruta SIN.
10. Etd1p impide la unión de Cdc16p-Byr4p en uno de los SPBs.
11. Las proteínas Etd1p, Rho1p y Sid2p están implicadas en la generación de la asimetría de Spg1p en la ruta SIN.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Nomenclatura

A lo largo de esta tesis, los genes de *Schizosaccharomyces pombe* se nombran con tres letras minúsculas en cursiva seguidas de un número; ej. *etd1*. Para los alelos mutantes se especifican detrás del gen separados por un guión; ej. *etd1-1*. Para hacer referencia a la proteína correspondiente se nombra con las mismas letras que el gen pero la primera letra en mayúscula y seguidas de una "p" y además no se escribe en cursiva; ej. Etd1p.

La delección de un gen se indica con el signo " Δ "; ej. *etd1* Δ . El signo "::" se utiliza para describir a un gen que ha sido reemplazado por otro; ej. *etd1::ura4* (el gen *ura4* reemplaza a *etd1*). El signo ":" indica una fusión entre dos secuencias de DNA; ej. *nmt:etd1* (el gen *etd1* está sometido a la expresión del promotor *nmt*).

Los sexos de *S. pombe* de cepas heterotálicas se indican como h^+ y h^- y son variaciones mutantes estables de la cepa homotálica original.

Cuando se indica el genotipo de una estirpe concreta, los *loci* a los que se hace referencia se separan por comas; ej. *leu1-32, ura4-D18*.

Si la cepa lleva un plásmido, se indica el genotipo de la cepa y separado por una barra inclinada se señala el plásmido que contiene; ej. *leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1*.

2. Estirpes utilizadas

Todas las cepas de *S. pombe* usadas en este trabajo se presentan en la tabla que se muestra a continuación.

Tabla MM.1 Cepas utilizadas		
Nº Cepa	Genotipo	Procedencia
RD 312	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18</i>	R. Daga
RD 313	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18</i>	R. Daga
JJ 900	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4</i>	Laboratorio
JJ 2034	<i>h- leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4</i>	Este trabajo
JJ 1165	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ1 (1-66aa)</i>	Este trabajo
JJ 1166	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ2 (1-133aa)</i>	Este trabajo
JJ 1167	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ3 (1-200aa)</i>	Este trabajo
JJ 1168	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ4 (1-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1169	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ5 (66-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1170	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ6 (133-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1171	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ7 (200-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1197	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ12 (66-133aa)</i>	Este trabajo
JJ 1198	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ8 (66-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1199	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ9 (133-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1200	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ10 (200-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1231	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 (66-100aa)</i>	Este trabajo
JJ 1232	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 (100-133aa)</i>	Este trabajo
JJ 1233	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1</i>	Laboratorio
JJ 1235	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP</i>	Laboratorio
JJ 1264	<i>h- leu1-32 / pRep41:EGFP:etd1 Δ11 (300-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1359	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ1 (1-66aa)</i>	Este trabajo
JJ 1370	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ2 (1-133aa)</i>	Este trabajo
JJ 1371	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ3 (1-200aa)</i>	Este trabajo

Tabla MM.1		Cepas utilizadas
Nº Cepa	Genotipo	Procedencia
JJ 1372	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ4 (1-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1373	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ5 (66-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1374	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ6 (133-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1375	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ7 (200-300aa)</i>	Este trabajo
JJ 1376	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ12 (66-133aa)</i>	Este trabajo
JJ 1377	<i>h- ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ8 (66-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1378	<i>h+ ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ9 (133-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1379	<i>h- ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 Δ10 (200-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1370	<i>h- ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1</i>	Laboratorio
JJ 1372	<i>ade6-216 leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP</i>	Laboratorio
JJ 1434	<i>h- ade6-216 leu1-32 ura4-D18 pab1::Kan</i>	Este trabajo
JJ 1437	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 pab1::Kan</i>	Este trabajo
JJ 1745	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 pab1::kan</i>	Este trabajo
JJ 1823	<i>leu1-32 ura4-D18 scd1::Kan etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Este trabajo
RD 701	<i>h+ ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat</i>	Fred Chang
JJ 1705	<i>h- ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat</i>	Este trabajo
JJ 1692	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat etd1::ura4</i>	Este trabajo
JJ 1421	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat pab1-4</i>	Este trabajo
JJ 1690	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat etd1::ura4 pab1-4</i>	Este trabajo
JJ 1723	<i>h- ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat rlc1:GFP:Kan</i>	Este trabajo
JJ 1724	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat rlc1:GFP:Kan</i>	Este trabajo
RD 702	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 rlc1:Tom:Nat</i>	Fred Chang
JJ 774	<i>h- leu1-32 ura4-D18 mob1:GFP:kan</i>	Laboratorio

Tabla MM.1		Cepas utilizadas
Nº Cepa	Genotipo	Procedencia
JJ 1838	<i>ade- leu1-32 ura4-D18 mob1:GFP:kan etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Este trabajo
JJ 1839	<i>leu1-32 ura4-D18 mob1:GFP:kan etd1::ura4 pab1-4</i>	Este trabajo
JJ 1782	<i>h- leu1-32 ura4-D18 rlc1:Tom:NatR mob1:GFP:Kan</i>	Este trabajo
JJ 1783	<i>h+ ade6- leu1-32 ura4-D18 rlc1:Tom:NatR mob1:GFP:Kan</i>	Este trabajo
JJ 1784	<i>h- ade6- leu1-32 ura4-D18 rlc1:Tom:NatR mob1:GFP:Kan pab1-4</i>	Este trabajo
JJ 1785	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 rlc1:Tom:NatR mob1:GFP:Kan pab1-4</i>	Este trabajo
JJ 1840	<i>leu1-32 ura4-D18 rlc1:Tom:NatR mob1:GFP:Kan pab1-4 etd1::ura4</i>	Este trabajo
JJ 1372	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP</i>	Este trabajo
JJ 1370	<i>h- ade6- leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1</i>	Este trabajo
JJ 1273	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 / pRep41:HA:rho1</i>	Este trabajo
JJ 1750	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6- cdc7:Tom:Nat / pRep41:HA:rho1</i>	Este trabajo
JJ 1752	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6- cdc7:Tom:Nat etd1::ura4 / pRep41:HA:rho1</i>	Este trabajo
JJ 1139	<i>h- ade6- leu1-32 HA:rho1</i>	Pilar Pérez
JJ 1201	<i>etd1::ura4 HA:rho1:ura4</i>	Laboratorio
JJ 1157	<i>h- leu1-32 ade6- HA:rho1:ura4 ret1-4</i>	Laboratorio
JJ 1184	<i>leu1-32 ade6- HA:rho1:ura4 ret1-4 etd1::ura4</i>	Laboratorio
JJ 1310	<i>h+leu1-32 ade6- HA:rho1:ura4 / pRep41:EGFP:etd1</i>	Este trabajo
JJ 1879	<i>h+leu1-32 ade6- HA:rho1:ura4 / pRep3:pab1</i>	Este trabajo
JJ 1541	<i>leu1-32 ade6- HA:rho1:ura4 / pRep41:EGFP</i>	Este trabajo
JJ 2034	<i>h- leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Laboratorio
JJ 2035	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Laboratorio
JJ 1847	<i>leu1-32 ura4-D18 ade- rga1::ura4</i>	Pilar Pérez
JJ 1849	<i>h- leu1-32 ura4-D18 rga5::ura4</i>	Pilar Pérez
JJ 1850	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 rga5::ura4</i>	Pilar Pérez
JJ 2042	<i>h- leu1-32 ura4-D18 rga8::Kan</i>	Pilar Pérez
JJ 2020	<i>leu1-32 ura4-D18 rga1::ura4 etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Este trabajo
JJ 2000	<i>leu1-32 ura4-D18 rga5::ura4 etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Este trabajo

Tabla MM.1		Cepas utilizadas
Nº Cepa	Genotipo	Procedencia
JJ 2061	<i>leu1-32 ura4-D18 rga8::Kan etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Este trabajo
JJ 2119	<i>leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat rga5::ura4</i>	Este trabajo
JJ 2113	<i>leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat rga5::ura4 etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Este trabajo
JJ 2152	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 etd1:ura4 /pRep41:YFP:rgf1</i>	Este trabajo
JJ 2152	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 etd1:ura4 /pRep41:YFP:rgf2</i>	Este trabajo
JJ 2173	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 etd1:ura4 / pRep41:rgf3</i>	Este trabajo
JJ 1392	<i>h+ ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tomato:Nat etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1</i>	Este trabajo
JJ 1393	<i>h+ ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tomato:Nat etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 $\Delta 8$ (66-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1394	<i>h+ ade6- leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tomato:Nat etd1::ura4 / pRep41:EGFP:etd1 $\Delta 10$ (200-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1311	<i>h+leu1-32 ade6- HA:rho1:ura4 / pRep41:EGFP:etd1 $\Delta 8$ (66-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1312	<i>h+leu1-32 ade6- HA:rho1:ura4 / pRep41:EGFP:etd1 $\Delta 10$ (200-391aa)</i>	Este trabajo
JJ 1799	<i>h+ leu1-32 cut11:GFP:ura4 cdc7:Tom:Nat</i>	Este trabajo
JJ 1303	<i>h- ura4-D18 leu1::cdc16promoter:cdc16:GFP:ura4</i>	V. Simanis
JJ 1305	<i>ura4-D18 leu1::cdc16promoter:cdc16:GFP:ura4 etd1::ura4 nmt81:etd1</i>	Este trabajo
JJ 1721	<i>leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat sid2-250</i>	Este trabajo
JJ 1802	<i>h- ura4-D18 sid2-as</i>	Este trabajo
JJ 1862	<i>h+ ade6- leu1-32 ura4-D18 sid2-as</i>	Este trabajo
JJ 1857	<i>h+ ade6- leu1-32 ura4-D18 sid2-as cdc7:Tomato:Nat</i>	Este trabajo
JJ 2134	<i>ade6- leu1-32 ura4-D18 sid2-as cdc7:Tomato:Nat leu1::cdc16promoter:cdc16GFP:ura4</i>	Este trabajo
JJ 1995	<i>h- ade- leu1-32 ura4-D18 / pREP42:Sid2:EGFP(Dendra)</i>	Este trabajo
RD 1407	<i>h- ade6- leu1-32 ura4-D18 hob3::ura4</i>	Pilar Pérez
JJ 1906	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat rlc1:GFP:Kan hob3::ura4</i>	Este trabajo
JJ 1917	<i>leu1-32 ura4-D18 cdc7:Tom:Nat rlc1:GFP:Kan drc1-191</i>	Este trabajo

Tabla M.1: Estirpes de *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

3. Medios y condiciones de cultivos

Los medios de cultivo utilizados durante la realización de este trabajo para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* son los descritos en (Moreno et al., 1991). Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2%. Todos los medios fueron preparados con agua destilada (Milli-Q) y esterilizados en el autoclave.

- **Medio rico YES (Yeast extract).** Se utilizó rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. El medio es suplementado con leucina, histidina, adenina, lisina y uracilo (250 mg/l).
- **Medio YES+Geneticina.** Se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* transformadas con el marcador de resistencia a geneticina. Está compuesto por YES suplementado con 100 µg/ml de sulfato de geneticina (G-418, Life Technologies).
- **EMM (Edinburgh Minimal Medium).** Se utilizó como medio en los experimentos de transformación de cepas de *S. pombe* auxótrofas para leucina o uracilo. Para llevar a cabo los experimentos de sobreexpresión con el promotor del gen nmt, las células se cultivaron en medio mínimo con los suplementos adecuados y tiamina (5µg/l), consiguiendo la represión del promotor (Maundrell, 1990). Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con MM nuevo y se reinocularon en medio mínimo sin tiamina, provocando la inducción del promotor y la expresión del gen regulado por él. El medio se suplementa con leucina, histidina, adenina o uracilo (225 mg/l) en aquellos casos en los que la cepa lo requiera.
- **Medio de esporulación (SPA).** Usado para inducir la conjugación y la esporulación en *S. pombe*.

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *Escherichia coli* fueron **Medio LB** (Luria Bertani) y **2xYT** preparados según (Sambrook et al., 1989). La selección de clones resistentes a antibióticos se realizó suplementando los medios con ampicilina (100 µg/ml).

Todos los experimentos se llevaron a cabo con cultivos en fase exponencial con una densidad óptica entre a 0.2-0.7 a 595 nm (entre 3×10^6 y 1×10^7 células/ml).

La temperatura rutinaria de crecimiento de los cultivos de *S. pombe* fue de 30°C. Para los mutantes termosensibles la temperatura de crecimiento permisiva fue de 25°C y la restrictiva 37°C y para el crecimiento de el mutante etd1Δ (criosensible) la temperatura permisiva fue de 37°C y la restrictiva 25°C.

Las células de *E. coli* se incubaron en medio líquido con agitación orbital a una temperatura de 37°C. Para el crecimiento en medios sólidos las células se incubaron en estufas a 37°C.

4. Métodos genéticos

4.1. Conjugación de cepas para generar dobles mutantes

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe*, se usaron estirpes heterotálicas de tipo sexual opuesto (h+ o h-) incubadas durante 24 horas en placa de medio YES. Se recogió aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa y se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (5 µl) sobre una placa de SPA. Los cigotos se originan al cabo de 12-20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 1-2 días de incubación a 25°C.

Para generar dobles mutantes se aislaron las ascosporas y posteriormente se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado:

- Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación. Las ascas resultantes de los cruces se micromanipularon en placas de YES y se analizó el fenotipo de las cuatro esporas de cada tétrada mediante réplicas en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas.
- Selección en masa. Se digirió la pared de las ascas con β -glucuronidasa (Sigma G0876) y se sembraron las esporas a temperatura permisiva en YES o EMM dependiendo del caso. Haciendo réplicas en diferentes medios o a distintas temperaturas se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado.

4.2. Ensayos de crecimiento en gota

Los ensayos de gota en placa se realizaron de la siguiente forma: se crecieron todas las cepas a ensayar hasta la misma densidad óptica (entre 0.4 y 0.6) y se hicieron 3 diluciones seriadas de 1/10, 1/100 y 1/1000. Posteriormente se sembraron las diluciones de cada cepa en el medio y la temperatura que requieran las cepas según el experimento que se vaya a llevar a cabo.

5. Técnicas generales de Biología Molecular

La clonación, selección y amplificación de plásmidos se llevó a cabo mediante transformación de cepas de *Escherichia coli* DH5 α crecidas en los medios de cultivo LB a 37°C.

Las preparaciones de DNA genómico así como la extracción de plásmidos se llevaron a cabo según (Moreno et al., 1991). Para la extracción de ADN plasmídico con mayor pureza se utilizó el High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche.

Los tratamientos con enzimas de restricción, enzimas modificadoras de DNA y las reacciones de PCR (BioTaq, Accuzyme, Long Expand Template System y *Phusion* High-Fidelity) se realizaron siguiendo las indicaciones suministradas por la empresa para cada uno de los productos.

Para las extracciones de DNA de geles de agarosa se utilizó el QIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen.

Para la secuenciación se siguió el método de (Sambrook et al., 2001). Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp PCR System 2400 usando reactivos BIGDye terminators DNA sequencing kit de acuerdo con las instrucciones del manual. Las muestras se procesaron mediante un equipo de secuenciación automática Perkin Elmer Abi Prism 310 y se analizaron con el programa SeqmanII de Lasergene. Algunas de las secuenciaciones se enviaron a la empresa de secuenciación SECUGEN (www.secugen.es).

Las transformaciones de células de *S. pombe* se realizaron mediante el método de acetato de litio (Bahler et al., 1998a).

Para la transformación de *E. coli* se siguió el protocolo descrito por Kushner(1978), utilizando bacterias competentes DH5 α .

5.1. Delección de *pab1*

La delección de *pab1* se generó por el recambio de la fase abierta de lectura del gen por el gen de resistencia a Kanamicina que procede del plásmido pFA6a-kanMX6, usando el sistema de PCR descrito por (Bahler et al., 1998b). La amplificación del gen de la *Kanamicina* se llevó a cabo con oligos de 100 nucleótidos, 80 nucleótidos corresponden a secuencias aguas arriba y aguas debajo de la fase abierta de lectura de *pab1*, y 20 nucleótidos corresponden a secuencias del plásmido pFA6a-kanMX6 a ambos lados del marcador de la Kanamicina. Los oligos se muestran a continuación:

Oligo	Secuencia
Pab1 forward	5'-AAGATCAAGATCTTCGTATACAATTGAAATTGGCAAAGTGTACCAACGGGA ACGAAATCTTAATATAATACGAGTAGAAGCGGATCCCCGGGTAAATTAA-3'
Pab1 reverse	5'-TCCCGGAAGTTCAATAAAAAAGGAACTATGTTTCAGTCTATCCGTAGATCATA AAAACAAACCAAACCTCCACATAAGGACAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'

5.2. Construcción de truncados de Etd1p

Para la construcción de diferentes truncados de Etd1p bajo el promotor nmt41 se amplificó la región del fragmento deseado con la enzima Accuzyme, utilizando como molde el plásmido pBSSK-etd1. El fragmento obtenido se subclonó en el plásmido de sobreexpresión pRep41EGFP (N) y el resultado se transformó en una cepa leu1-32. Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación.

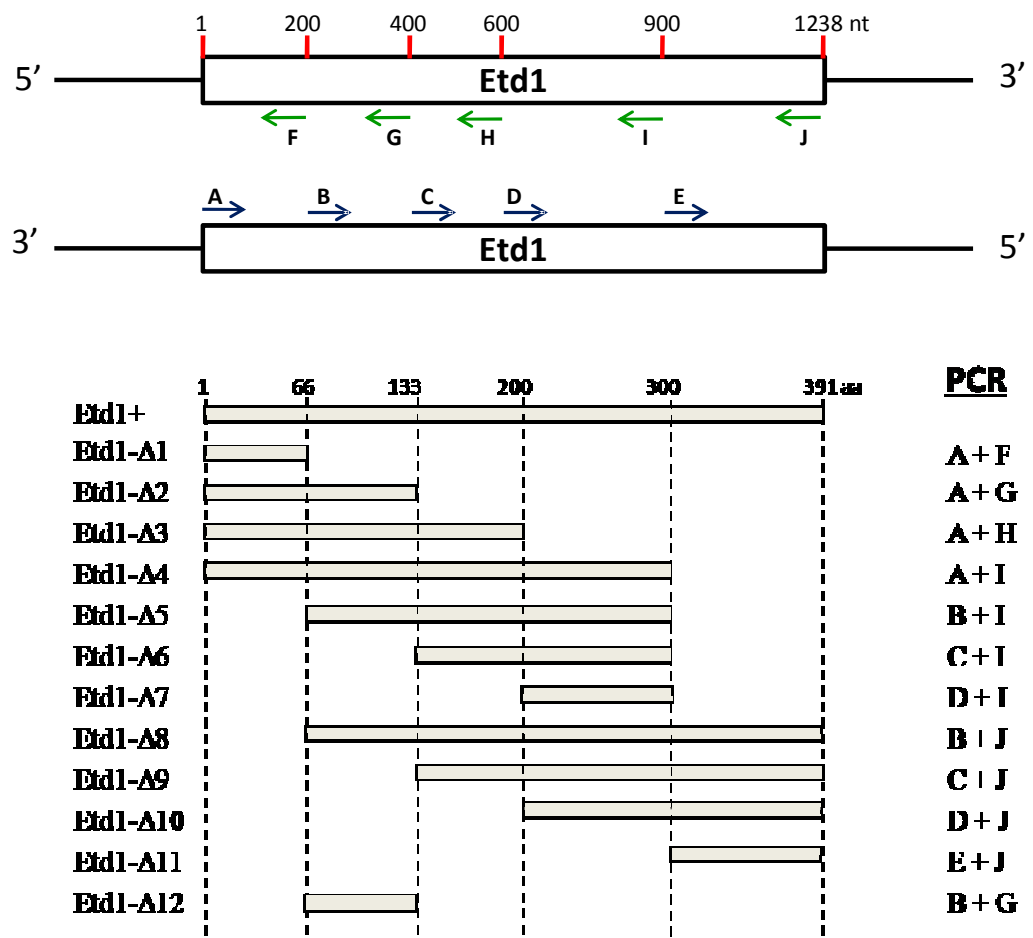


Figura M.1: Construcción de truncados de Etd1.

Oligonucleótidos	Secuencia
(A) 1-etd1 knockout	5'- GTGAACGC CATATG GGAGTTGTATACGGCAG -3' (Diana NdeI)
(B) 200-etd1 knockout	5'- CGCACGGC CATATG AAAGAAGTTAACACCTCCG -3'
(C) 400-etd1 knockout	5'- CGCACGGC CATATG GGCAACTGTAAAAAACTGCG -3'
(D) 600-etd1 knockout	5'- GCGACTGC CATATG CAAGAAGATGAGAGTTCCG -3'
(E) 900-etd1 knockout	5'- GCGCCGGC CATATG TCCATCAAAGGTAAGACATTC -3'
(F) etd1-200 knockout	5'- TAA CCCGGG CTATAATCCAAGCTGTTAGG -3' (Diana SmaI)
(G) etd1-400 knockout	5'- GAA CCCGGG CTATTTGTTTATCTCATTCGC -3'
(H) etd1-600 knockout	5'- AATA CCCGGG CTAATCTTCTTGCGTAGTCGCACC -3'
(I) etd1-900 knockout	5'- GGA CCCGGG CTATTTGATGGATCTCGTAAATTCC -3'
(J) Sma-EGFP-N	5'- TAGATACTT CCCGGG CCATTAATG -3'
(K) 300-etd1 knockout	5'- GCGCCGGC CATATG ATTTTTTCATTCATAGGAG -3'
(L) etd1-300 knockout	5'- GGA CCCGGG CTACGTTTAGAAAATTTTCGGG -3'

5.3. Construcción del mutante *sid2-as*

Para la construcción del mutante *sid2-as* (“analogue-sensitive”), sustituimos la metionina M285 por Glicina e integramos esta mutación en el propio promotor de *sid2* según el protocolo de (Gegan et al., 2007). El procedimiento seguido fue amplificar con la enzima Phusion High Fidelity el gen Sid2 desde un genómico silvestre en dos partes, introduciendo la mutación (cambio de ATG por GGG) en los oligonucleótidos utilizados (la mutación se muestra en rojo en la secuencia del oligonucleótido).

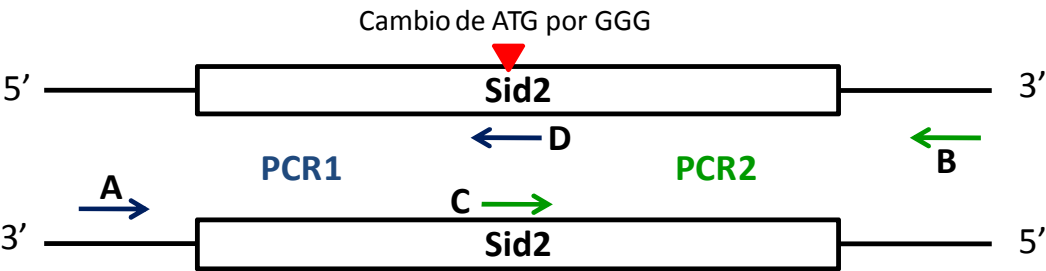


Figura M.2. Construcción del mutante sid2-as. Los oligonucleótidos utilizados se representan con flechas azules y con un triángulo rojo se indica el punto donde está la mutación

Los dos productos de PCR se juntaron mediante otra reacción de PCR, ya que presentan secuencias complementarias y el fragmento resultante se transformó en una cepa silvestre. Los clones positivos se seleccionaron haciendo réplicas en placas con el análogo 1-NM-PP1 (1-(1,1-dimethylethyl)-3-(1-naphthalenylmethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine) a una concentración de 10µM. Posteriormente se secuenció uno de los clones seleccionados y se vio que presentaba la mutación.

Oligonucleótidos	Secuencia
(A) 5' Promotor Sid2	5' GGGTAAATGGCTGATACCTAACTCCGATGG 3'
(B) 3' Terminador Sid2	5' ATTGCAGATAGTGTCTATTTCCCTATCAAG 3'
(C) Mutagénesis Sid2	5' TTCAGGATACTTCAAACATTATCTCGCTGGGAATTGTTCTGGTG 3'
(D) Mutagénesis Sid2 anti sens	5' CACCAGGAACAAATTCCAGCGAGATAAATGTTTGAAGTATCCTGAA 3'

6. Análisis de proteínas

6.1. Western-Blot

- **Obtención de extractos celulares**

Los ensayos de Western-blot y precipitación se realizaron a partir de extractos celulares crecidos a una densidad óptica entre 0,5 y 0,8. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con stop buffer (150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 1 mM NaN₃ pH 8.0). Las extracciones de proteínas se realizaron utilizando el tampón adecuado para cada experimento, utilizando como inhibidores de proteasas un cóctel de inhibidores de Roche, con o sin EDTA según el experimento.

Las células se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, Sigma), en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6,0 y se comprobó la rotura celular por observación al microscopio. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico del ácido Bicinchonínico.

- **Electroforesis y electrotransferencia**

Los análisis por Western-blot se llevaron a cabo cargando cantidades equivalentes de proteína en geles de SDS-poliacrilamida de distinto porcentaje en función del experimento. El equipo utilizado para la fabricación de los geles, la electroforesis y la transferencia fue el Mini-PROTEAN-Electrophoresis-System de Bio-Rad.

Para la transferencia se usaron membranas de nitrocelulosa (Hybron ECL Nitrodellulose Membrana, Amersham Pharmacia Biotech) y el tampón formado por 10% de Metanol y 1% de CAPS.

- **Inmunodetección de proteínas**

Las membranas se bloquearon con leche al 10% en PBST (PBS 0.01% de Tween 20) durante 30-60 minutos. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en PBST al 5% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Se hicieron 4 lavado de 5 minutos con abundante PBST y se incubaron después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa (HRP, “horseradish peroxidase”) durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se volvieron a lavar 4 veces con PBST y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia (ECL o Super Signal según el caso). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron usando películas de autorradiografía Kodak X-Omat (Sigma ref. F-5513).

Tabla MM.2 ANTICUERPOS				
Nombre	Origen	Tipo	Condiciones	Procedencia
anti-GFP (Clones 7.1 y 13.1)	Mouse	Monoclonal	1:1000	Roche 1 814 460
anti-GFP F-7	Mouse	Monoclonal	1:5000	Paul Nurse Lab Santa Cruz Biotech
anti-HA Clone HA-7	Mouse	Monoclonal	1.1000	Sigma H3763
anti-HA:HRP	Mouse	Monoclonal	1:5000	Paul Nurse Lab
anti- α -tubulina (Clone B-5-1-2)	Mouse	Monoclonal	1:5000	Sigma T5168
anti-PSTAIR	Mouse	Monoclonal	1:1000	Sigma P7962
Anti-Mouse IgG- Peroxidase	Goat	Monoclonal	1:1000	Sigma A-5278

Tabla M.2: Anticuerpos utilizados en este trabajo.

6.2. Coinmunoprecipitación

Los extractos fueron obtenidos a partir de cultivos de 5×10^8 células expresando las proteínas correspondientemente marcadas, como se detalla anteriormente. Para realizar los extractos se usaron 300 μ l de un tampón de lisis que contenía 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl y 0.5% NP-40, al que se añadió como inhibidor el cocktail de Roche *Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor cocktail tablets*; Roche, ref 1 837 170.

Los extractos se cuantificaron y 2 mg de proteína total fueron incubados con 1 μ g del anticuerpo anti-GFP (Paul Nurse Lab) durante 2 horas a 4°C en un volumen final de 500 μ l de tampón de lisis. Posteriormente, esta mezcla se incubó con 30 μ l de bolitas de proteína A-sefarosa (Protein A shepharose CL-4B, GE Healthcare) al 50% durante 2-4 horas en agitación a 4°C. Los complejos unidos a la matriz de sefarosa se sedimentaron por centrifugación y se lavaron 4 veces con 1ml de tampón de lisis. Finalmente, las bolitas de proteína A-sefarosa se resuspendieron en 30 μ l de tampón de carga 2X para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

6.3. Medida de Rho1p activo (GTP-Rho1p)

- **Producción de GST-RBD**

La cantidad de Rho1p activa se determinó mediante el ensayo de precipitación con GST-RBD. Este dominio sólo se asocia a Rho1p cuando está unida a GTP. La proteína recombinante GST-RBD se obtuvo en una cepa *DH5 α* de *E. coli* transformada con el plásmido pGEX-RBD, que contiene el dominio de unión a RhoA (RBD: Rho binding domain) de la proteína rotequina fusionada a la secuencia que codifica la proteína GST (Reid et al., 1996). Las bacterias transformadas se incubaron a 28°C en 500 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) hasta que alcanzaron una D.O. a 595 nm de 0,6. En este momento, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión del gen que codifica la proteína de fusión y se incubaron 3 horas más a 28°C.

Se recogieron las células por centrifugación a 5.000rpm y se resuspendieron en 20 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂HPO₄ 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM) frío al que se añadieron previamente inhibidores de proteasas (Cóctel de Roche Complete Mini EDTA- free) y lisozima (2mg/ml). Tras 30 minutos de incubación en hielo, las células se sonicaron 4 veces a una potencia media durante 30 segundos. Se añadió Tritón TX-100 a una concentración final del 1% y se centrifugaron las células lisadas a 10.000 rpm durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se añadieron 600 µl de glutation-sefarosa al 50% previamente equilibrada con PBS y se incubó durante 2 horas a 4°C. A continuación, las bolas de glutation-sefarosa con la proteína de fusión GST-RBD unida, se lavaron 3 veces con 40 ml de PBS, recogándose por centrifugación a 3.000 rpm. Por último, se resuspendieron al 50% en solución de lisis B: Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 20 mM, glicerol al 10%, MgCl₂ 2mM, DTT 0,1 mM y NP-40 al 0,5%, con inhibidores de proteasas.

La cantidad de proteína se cuantificó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie, comparándola con diferentes cantidades de seroalbúmina bovina.

- **Ensayo de unión**

Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio que expresaban HA-Rho1 utilizando el tampón de lisis B descrito en el apartado anterior. Los extractos (2 mg de proteína total), se llevaron a 500 µl con tampón de lisis B y se añadieron 10 µg de GST-RBD asociado a bolas de glutation sefarosa, que habíamos preparado anteriormente. Se incubaron 2-4 horas a 4°C y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis B. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X y se realizó la electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12%. Tras la transferencia las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HA 12CA5 para detectar la fracción de la proteína HA-Rho1p unida a GTP que había precipitado al unirse al dominio RBD.

7. Técnicas generales de biología celular y microscopía

7.1. Microscopios y técnicas utilizadas

Para visualizar las células tanto al visible como con fluorescencia, fijadas o *in vivo*, utilizamos tres tipos distintos de microscopios:

- Microscopio Leica DMRE con equipo de epifluorescencia conectado a una cámara de vídeo CCD.

- Equipo Delta-Vision wide-field microscope systems (Applied Precision, Issaquah, WA).

- Spinning Disk Confocal Microscope (Roper Scientific-Photometrics).

Para las técnicas generales de biología celular como tinción con DAPI y calcoflúor se recogió un volumen de cultivo en fase exponencial, se centrifugó y tras lavar una vez con agua, las células se fijaron con 1 ml de etanol al 70% frío y se guardaron a 4°C hasta su procesamiento. Para la tinción se siguió el protocolo descrito en (Alfa et al., 1993).

Para los experimento de microscopía *in vivo*, los cultivos se llevaron hasta fase exponencial (DO: 0,2-0,5), se concentraron por centrifugación a 3000rpm y se resuspendieron en 100ml de medio. 5µl de esta suspensión se depositó en placas de MatTek de 35 mm (P35-1.5-10-C; MatTek) a las que se fijaron usando 1 mg/ml soybean lectin (L1395; Sigma-Aldrich) y se añadió 3ml de medio. Se tomaron imágenes cada 5 minutos realizando entre 10 y 20 cortes de 0.5 µm de grosor, según las condiciones. Las imágenes del Delta Vision fueron deconvolucionadas y se seleccionó la proyección máxima.

La fotoactivación de Sid2p-GFP(Dendra) se realizó con el láser de λ 405nm con un pulso de 100 ms y una potencia de láser del 60%. Las imágenes se tomaron cada 2 segundos con los láseres de λ 491nm y 561nm.

7.2. Análisis de imagen

Las mediciones de los parámetros celulares (tamaño, cuantificaciones, etc..) y los procesamientos de imágenes se realizaron con los programas Adobe Photoshop, ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), Metamorph y Excel.

La medida de la intensidad de Cdc7p se realizó utilizando el software del Image J (NIH, Bethesda, MD); se midió la intensidad máxima de un círculo alrededor del SPB (Daga et al., 2005) y se restó el ruido de fondo de una región citosólica próxima.

El diámetro del anillo de Mob1p-GFP fue cuantificado también usando el programa Image J, midiendo la longitud de una línea situada a lo largo del diámetro del anillo.

El análisis de los experimentos de fotoactivación de Sid2p-GFP(Dendra) se realizó con las herramientas de FRAP disponibles en el programa ImageJ.

BIBLIOGRAFÍA

Alfa, C. E., Gallagher, I. M. and Hyams, J. S. (1993). Antigen localization in fission yeast. *Methods Cell Biol* **37**, 201-22.

Almonacid, M., Celton-Morizur, S., Jakubowski, J. L., Dingli, F., Loew, D., Mayeux, A., Chen, J. S., Gould, K. L., Clifford, D. M. and Paoletti, A. (2011). Temporal control of contractile ring assembly by Plo1 regulation of myosin II recruitment by Mid1/anillin. *Curr Biol* **21**, 473-9.

Almonacid, M., Moseley, J. B., Janvire, J., Mayeux, A., Fraissier, V., Nurse, P. and Paoletti, A. (2009). Spatial control of cytokinesis by Cdr2 kinase and Mid1/anillin nuclear export. *Curr Biol* **19**, 961-6.

Alonso-Nunez, M. L., An, H., Martin-Cuadrado, A. B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., del Rey, F., Gould, K. L. and de Aldana, C. R. (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **16**, 2003-17.

An, H., Morrell, J. L., Jennings, J. L., Link, A. J. and Gould, K. L. (2004). Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization, and function. *Mol Biol Cell* **15**, 5551-64.

Arai, R. and Mabuchi, I. (2002). F-actin ring formation and the role of F-actin cables in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **115**, 887-98.

Arellano, M., Duran, A. and Perez, P. (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J* **15**, 4584-91.

Arellano, M., Duran, A. and Perez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **110 (Pt 20)**, 2547-55.

Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Duran, A. and Perez, P. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci* **112 (Pt 20)**, 3569-78.

Bahler, J. and Pringle, J. R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* **12**, 1356-70.

Bahler, J., Steever, A. B., Wheatley, S., Wang, Y., Pringle, J. R., Gould, K. L. and McCollum, D. (1998a). Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol* **143**, 1603-16.

Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998b). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-51.

Balasubramanian, M. K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K. C., Naqvi, N. I., He, X., Sazer, S. and Gould, K. L. (1998). Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* **149**, 1265-75.

Balasubramanian, M. K., McCollum, D. and Surana, U. (2000). Tying the knot: linking cytokinesis to the nuclear cycle. *J Cell Sci* **113 (Pt 9)**, 1503-13.

Bardin, A. J. and Amon, A. (2001). Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 815-26.

Bardin, A. J., Visintin, R. and Amon, A. (2000). A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell* **102**, 21-31.

Bathe, M. and Chang, F. (2009). Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast: towards a systems-level understanding. *Trends Microbiol* **18**, 38-45.

Beltraminelli, N., Murone, M. and Simanis, V. (1999). The *S. pombe* *zfs1* gene is required to prevent septation if mitotic progression is inhibited. *J Cell Sci* **112 Pt 18**, 3103-14.

Berlin, A., Paoletti, A. and Chang, F. (2003). Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J Cell Biol* **160**, 1083-92.

Bertazzi, D. T., Kurtulmus, B. and Pereira, G. (2011). The cortical protein Lte1 promotes mitotic exit by inhibiting the spindle position checkpoint kinase Kin4. *J Cell Biol* **193**, 1033-48.

Bi, E., Maddox, P., Lew, D. J., Salmon, E. D., McMillan, J. N., Yeh, E. and Pringle, J. R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* **142**, 1301-12.

Bishop, A. C., Ubersax, J. A., Petsch, D. T., Matheos, D. P., Gray, N. S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J. Z., Schultz, P. G., Rose, M. D. et al. (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401.

Bishop, A. L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-55.

Bos, J. L., Rehmann, H. and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-77.

Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-27.

Burgess, D. R. (2005). Cytokinesis: new roles for myosin. *Curr Biol* **15**, R310-1.

Bustelo, X. R., Sauzeau, V. and Berenjano, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**, 356-70.

Calonge, T. M., Arellano, M., Coll, P. M. and Perez, P. (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **47**, 507-18.

Calonge, T. M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I. and Perez, P. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol Biol Cell* **11**, 4393-401.

Carnahan, R. H. and Gould, K. L. (2003). The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* **162**, 851-62.

Cerutti, L. and Simanis, V. (1999). Asymmetry of the spindle pole bodies and spg1p GAP segregation during mitosis in fission yeast. *J Cell Sci* **112 (Pt 14)**, 2313-21.

Clifford, D. M., Wolfe, B. A., Roberts-Galbraith, R. H., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd and Gould, K. L. (2008). The Clp1/Cdc14 phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related Mid1. *J Cell Biol* **181**, 79-88.

Coffman, V. C., Nile, A. H., Lee, I. J., Liu, H. and Wu, J. Q. (2009). Roles of formin nodes and myosin motor activity in Mid1p-dependent contractile-ring assembly during fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* **20**, 5195-210.

Coll, P. M., Rincon, S. A., Izquierdo, R. A. and Perez, P. (2007). Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *EMBO J* **26**, 1865-77.

Cortes, J. C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sanchez, Y., Duran, A. and Ribas, J. C. (2005). The novel fission yeast (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci* **118**, 157-74.

Cortes, J. C., Ishiguro, J., Duran, A. and Ribas, J. C. (2002). Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* **115**, 4081-96.

Cortes, J. C., Konomi, M., Martins, I. M., Munoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., Duran, A. and Ribas, J. C. (2007). The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol* **65**, 201-17.

Cueille, N., Salimova, E., Esteban, V., Blanco, M., Moreno, S., Bueno, A. and Simanis, V. (2001). Flp1, a fission yeast orthologue of the *S. cerevisiae* CDC14 gene, is not required for cyclin degradation or rum1p stabilisation at the end of mitosis. *J Cell Sci* **114**, 2649-64.

Chang, F., Woollard, A. and Nurse, P. (1996). Isolation and characterization of fission yeast mutants defective in the assembly and placement of the contractile actin ring. *J Cell Sci* **109 (Pt 1)**, 131-42.

Chang, L. and Gould, K. L. (2000). Sid4p is required to localize components of the septation initiation pathway to the spindle pole body in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5249-54.

Chang, L., Morrell, J. L., Feoktistova, A. and Gould, K. L. (2001). Study of cyclin proteolysis in anaphase-promoting complex (APC) mutant cells reveals the requirement for APC function in the final steps of the fission yeast septation initiation network. *Mol Cell Biol* **21**, 6681-94.

Chen, C. T., Feoktistova, A., Chen, J. S., Shim, Y. S., Clifford, D. M., Gould, K. L. and McCollum, D. (2008). The SIN kinase Sid2 regulates cytoplasmic retention of the *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1. *Curr Biol* **18**, 1594-9.

Chudakov, D. M., Lukyanov, S. and Lukyanov, K. A. (2007). Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques* **42**, 553, 555, 557 passim.

Daga, R. R. and Chang, F. (2005). Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8228-32.

Daga, R. R., Lahoz, A., Munoz, M. J., Moreno, S. and Jimenez, J. (2005). Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *EMBO J* **24**, 2436-46.

Das, M., Wiley, D. J., Chen, X., Shah, K. and Verde, F. (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol* **19**, 1314-9.

Dekker, N., Speijer, D., Grun, C. H., van den Berg, M., de Haan, A. and Hochstenbach, F. (2004). Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* **15**, 3903-14.

DerMardirossian, C. and Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**, 356-63.

Desai, A. (2000). Kinetochores. *Curr Biol* **10**, R508.

Ding, R., West, R. R., Morphew, D. M., Oakley, B. R. and McIntosh, J. R. (1997). The spindle pole body of *Schizosaccharomyces pombe* enters and leaves the nuclear envelope as the cell cycle proceeds. *Mol Biol Cell* **8**, 1461-79.

Dischinger, S., Krapp, A., Xie, L., Paulson, J. R. and Simanis, V. (2008). Chemical genetic analysis of the regulatory role of Cdc2p in the *S. pombe* septation initiation network. *J Cell Sci* **121**, 843-53.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.

Falk, J. E., Chan, L. Y. and Amon, A. (2011). Lte1 promotes mitotic exit by controlling the localization of the spindle position checkpoint kinase Kin4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12584-90.

Fankhauser, C. and Simanis, V. (1993). The *Schizosaccharomyces pombe* *cdc14* gene is required for septum formation and can also inhibit nuclear division. *Mol Biol Cell* **4**, 531-9.

Faty, M., Fink, M. and Barral, Y. (2002). Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet* **41**, 123-31.

Fournier, N., Cerutti, L., Beltraminelli, N., Salimova, E. and Simanis, V. (2001). Bypass of the requirement for *cdc16p* GAP function in *Schizosaccharomyces pombe* by mutation of the septation initiation network genes. *Arch Microbiol* **175**, 62-9.

Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T. and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**, 438-41.

Furge, K. A., Wong, K., Armstrong, J., Balasubramanian, M. and Albright, C. F. (1998). Byr4 and Cdc16 form a two-component GTPase-activating protein for the Spg1 GTPase that controls septation in fission yeast. *Curr Biol* **8**, 947-54.

Garcia-Cortes, J. C. and McCollum, D. (2009). Proper timing of cytokinesis is regulated by *Schizosaccharomyces pombe* Etd1. *J Cell Biol* **186**, 739-53.

Garcia, I., Jimenez, D., Martin, V., Duran, A. and Sanchez, Y. (2005). The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* **97**, 569-76.

Garcia, P., Garcia, I., Marcos, F., de Garibay, G. R. and Sanchez, Y. (2009a). Fission yeast rgf2p is a rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of rgf1p. *Genetics* **181**, 1321-34.

Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. and Sanchez, Y. (2006a). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 1620-31.

Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. and Sanchez, Y. (2006b). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* **23**, 1031-43.

Garcia, P., Tajadura, V. and Sanchez, Y. (2009b). The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 721-31.

Gardner, R. D. and Burke, D. J. (2000). The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* **10**, 154-8.

Geymonat, M., Spanos, A., de Bettignies, G. and Sedgwick, S. G. (2009). Lte1 contributes to Bfa1 localization rather than stimulating nucleotide exchange by Tem1. *J Cell Biol* **187**, 497-511.

Geymonat, M., Spanos, A., Jensen, S. and Sedgwick, S. G. (2010). Phosphorylation of Lte1 by Cdk prevents polarized growth during mitotic arrest in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* **191**, 1097-112.

Geymonat, M., Spanos, A., Smith, S. J., Wheatley, E., Rittinger, K., Johnston, L. H. and Sedgwick, S. G. (2002). Control of mitotic exit in budding yeast. In vitro regulation of Tem1 GTPase by Bub2 and Bfa1. *J Biol Chem* **277**, 28439-45.

Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* **307**, 1735-9.

Gould, K. L. and Simanis, V. (1997). The control of septum formation in fission yeast. In *Genes Dev*, vol. 11, pp. 2939-51.

Goyal, A., Takaine, M., Simanis, V. and Nakano, K. (2011). Dividing the spoils of growth and the cell cycle: The fission yeast as a model for the study of cytokinesis. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 69-88.

Gregan, J., Zhang, C., Rumpf, C., Cipak, L., Li, Z., Uluocak, P., Nasmyth, K. and Shokat, K. M. (2007). Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Protoc* **2**, 2996-3000.

Guertin, D. A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K. L. and McCollum, D. (2000). The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *EMBO J* **19**, 1803-15.

Guertin, D. A., Trautmann, S. and McCollum, D. (2002a). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 155-78.

Guertin, D. A., Venkatram, S., Gould, K. L. and McCollum, D. (2002b). Dma1 prevents mitotic exit and cytokinesis by inhibiting the septation initiation network (SIN). *Dev Cell* **3**, 779-90.

Hachet, O. and Simanis, V. (2008). Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev* **22**, 3205-16.

Hagan, I. M. (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci* **111** (Pt 12), 1603-12.

He, X., Patterson, T. E. and Sazer, S. (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7965-70.

Heasman, S. J. and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701.

Heath, I. B. and Rethoret, K. (1980). Temporal analysis of the nuclear cycle by serial section electron microscopy of the fungus, *Saprolegnia ferax*. *Eur J Cell Biol* **21**, 208-13.

Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J. and Klausner, R. D. (1998). Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9161-6.

Holloway, S. L., Glotzer, M., King, R. W. and Murray, A. W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell* **73**, 1393-402.

Hou, M. C., Guertin, D. A. and McCollum, D. (2004). Initiation of cytokinesis is controlled through multiple modes of regulation of the Sid2p-Mob1p kinase complex. *Mol Cell Biol* **24**, 3262-76.

Hou, M. C., Salek, J. and McCollum, D. (2000). Mob1p interacts with the Sid2p kinase and is required for cytokinesis in fission yeast. *Curr Biol* **10**, 619-22.

Huang, Y., Yan, H. and Balasubramanian, M. K. (2008). Assembly of normal actomyosin rings in the absence of Mid1p and cortical nodes in fission yeast. *J Cell Biol* **183**, 979-88.

Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S. A. and Osumi, M. (2001). In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**, 433-44.

Iden, S. and Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 846-59.

Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C. and Nasmyth, K. (1995). Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* **81**, 269-78.

Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69.

Janssens, V. and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**, 417-39.

Jiang, W. and Hallberg, R. L. (2000). Isolation and characterization of par1(+) and par2(+): two *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding B' subunits of protein phosphatase 2A. *Genetics* **154**, 1025-38.

Jiang, W. and Hallberg, R. L. (2001). Correct regulation of the septation initiation network in *Schizosaccharomyces pombe* requires the activities of par1 and par2. *Genetics* **158**, 1413-29.

Jimenez, J. and Oballe, J. (1994). Ethanol-hypersensitive and ethanol-dependent cdc- mutants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **245**, 86-95.

Jin, Q. W. and McCollum, D. (2003). Scw1p antagonizes the septation initiation network to regulate septum formation and cell separation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **2**, 510-20.

Jin, Q. W., Zhou, M., Bimbo, A., Balasubramanian, M. K. and McCollum, D. (2006). A role for the septation initiation network in septum assembly revealed by genetic analysis of sid2-250 suppressors. *Genetics* **172**, 2101-12.

Johnson, A. E. and Gould, K. L. (2011). Dma1 ubiquitinates the SIN scaffold, Sid4, to impede the mitotic localization of Plo1 kinase. *EMBO J* **30**, 341-54.

Kadura, S., He, X., Vanoosthuyse, V., Hardwick, K. G. and Sazer, S. (2005). The A78V mutation in the Mad3-like domain of *Schizosaccharomyces pombe* Bub1p perturbs nuclear accumulation and kinetochore targeting of Bub1p, Bub3p, and Mad3p and spindle assembly checkpoint function. *Mol Biol Cell* **16**, 385-95.

Kadura, S. and Sazer, S. (2005). SAC-ing mitotic errors: how the spindle assembly checkpoint (SAC) plays defense against chromosome mis-segregation. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**, 145-60.

Karagiannis, J., Bimbo, A., Rajagopalan, S., Liu, J. and Balasubramanian, M. K. (2005). The nuclear kinase Lsk1p positively regulates the septation initiation network and promotes the successful completion of cytokinesis in response to perturbation of the actomyosin ring in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **16**, 358-71.

Karagiannis, J., Oulton, R. and Young, P. G. (2002). The Scw1 RNA-binding domain protein regulates septation and cell-wall structure in fission yeast. *Genetics* **162**, 45-58.

Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Perez, P. and Toda, T. (1999). Fission yeast alpha-glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J Cell Biol* **144**, 1173-86.

Keng, T., Clark, M. W., Storms, R. K., Fortin, N., Zhong, W., Ouellette, B. F., Barton, A. B., Kaback, D. B. and Bussey, H. (1994). LTE1 of *Saccharomyces cerevisiae* is a 1435 codon open reading frame that has sequence similarities to guanine nucleotide releasing factors. *Yeast* **10**, 953-8.

Kinoshita, K., Nemoto, T., Nabeshima, K., Kondoh, H., Niwa, H. and Yanagida, M. (1996). The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells* **1**, 29-45.

Kinoshita, N., Ohkura, H. and Yanagida, M. (1990). Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* **63**, 405-15.

Kinoshita, N., Yamano, H., Niwa, H., Yoshida, T. and Yanagida, M. (1993). Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes Dev* **7**, 1059-71.

Krapp, A., Cano, E. and Simanis, V. (2003). Mitotic hyperphosphorylation of the fission yeast SIN scaffold protein cdc11p is regulated by the protein kinase cdc7p. *Curr Biol* **13**, 168-72.

Krapp, A., Collin, P., Cano Del Rosario, E. and Simanis, V. (2008). Homeostasis between the GTPase Spg1p and its GAP in the regulation of cytokinesis in *S. pombe*. *J Cell Sci* **121**, 601-8.

Krapp, A., Gulli, M. P. and Simanis, V. (2004). SIN and the art of splitting the fission yeast cell. *Curr Biol* **14**, R722-30.

Krapp, A., Schmidt, S., Cano, E. and Simanis, V. (2001). *S. pombe* cdc11p, together with sid4p, provides an anchor for septation initiation network proteins on the spindle pole body. *Curr Biol* **11**, 1559-68.

Krapp, A. and Simanis, V. (2005). Cell division: SIN, cytokinesis and ethanol dependency. *Curr Biol* **15**, R605-7.

Kushner, S. R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids. In *Genetic Engineering* (Boyer, H. B., and Nicosia, S. eds.) pp. 17-23. Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Lahoz, A., Alcaide-Gavilan, M., Daga, R. R. and Jimenez, J. (2010). Antagonistic Roles of PP2A-Pab1 and Etd1 in the Control of Cytokinesis in Fission Yeast. *Genetics*.

Lattmann, E., Krapp, A. and Simanis, V. (2009). Cytokinesis: Closure resets your SIN. *Curr Biol* **19**, R1040-2.

Le Goff, X., Buvelot, S., Salimova, E., Guerry, F., Schmidt, S., Cueille, N., Cano, E. and Simanis, V. (2001). The protein phosphatase 2A B'-regulatory subunit par1p is implicated in regulation of the *S. pombe* septation initiation network. *FEBS Lett* **508**, 136-42.

Le Goff, X., Woollard, A. and Simanis, V. (1999). Analysis of the *cps1* gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **262**, 163-72.

Li, C., Furge, K. A., Cheng, Q. C. and Albright, C. F. (2000). Byr4 localizes to spindle-pole bodies in a cell cycle-regulated manner to control Cdc7 localization and septation in fission yeast. *J Biol Chem* **275**, 14381-7.

Lippincott-Schwartz, J. and Patterson, G. H. (2008). Fluorescent proteins for photoactivation experiments. *Methods Cell Biol* **85**, 45-61.

Liu, J., Tang, X., Wang, H. and Balasubramanian, M. (2000a). Bgs2p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **478**, 105-8.

Liu, J., Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S. and Balasubramanian, M. K. (2002). The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **13**, 989-1000.

Liu, J., Wang, H. and Balasubramanian, M. K. (2000b). A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **113** (Pt 7), 1223-30.

Liu, J., Wang, H., McCollum, D. and Balasubramanian, M. K. (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **153**, 1193-203.

Loewith, R., Hubberstey, A. and Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **113** (Pt 1), 153-60.

Longtine, M. S. and Bi, E. (2003). Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol* **13**, 403-9.

Longtine, M. S., Fares, H. and Pringle, J. R. (1998). Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* **143**, 719-36.

Loo, T. H. and Balasubramanian, M. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pak-related protein, Pak1p/Orb2p, phosphorylates myosin regulatory light chain to inhibit cytokinesis. *J Cell Biol* **183**, 785-93.

Lord, M., Sladewski, T. E. and Pollard, T. D. (2008). Yeast UCS proteins promote actomyosin interactions and limit myosin turnover in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8014-9.

Lord, M. (2010). Cytokinesis Mechanisms in Yeast. *Nature Education* **3**(9):53

Martin-Cuadrado, A. B., Duenas, E., Sipiczki, M., Vazquez de Aldana, C. R. and del Rey, F. (2003). The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **116**, 1689-98.

Martin-Cuadrado, A. B., Morrell, J. L., Konomi, M., An, H., Petit, C., Osumi, M., Balasubramanian, M., Gould, K. L., Del Rey, F. and de Aldana, C. R. (2005). Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell* **16**, 4867-81.

Martin, S. G. and Berthelot-Grosjean, M. (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* **459**, 852-6.

Martin, V., Garcia, B., Carnero, E., Duran, A. and Sanchez, Y. (2003). Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **2**, 159-69.

Martin, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Duran, A. and Sanchez, Y. (2000). bgs2+, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* **38**, 308-21.

Maundrell, K. (1990). nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**, 10857-64.

Mayer-Jaekel, R. E. and Hemmings, B. A. (1994). Protein phosphatase 2A-a 'menage a trois'. *Trends Cell Biol* **4**, 287-91.

McAvoy, T., Zhou, M. M., Greengard, P. and Nairn, A. C. (2009). Phosphorylation of Rap1GAP, a striatally enriched protein, by protein kinase A controls Rap1 activity and dendritic spine morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3531-6.

Mehta, S. and Gould, K. L. (2006). Identification of functional domains within the septation initiation network kinase, Cdc7. *J Biol Chem* **281**, 9935-41.

Memon, A. R. (2004). The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *Biochim Biophys Acta* **1664**, 9-30.

Mikawa, M., Su, L. and Parsons, S. J. (2008). Opposing roles of p190RhoGAP and Ect2 RhoGEF in regulating cytokinesis. *Cell Cycle* **7**, 2003-12.

Miller, P. J. and Johnson, D. I. (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **14**, 1075-83.

Minet, M., Nurse, P., Thuriaux, P. and Mitchison, J. M. (1979). Uncontrolled septation in a cell division cycle mutant of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **137**, 440-6.

Mishra, M., Karagiannis, J., Sevugan, M., Singh, P. and Balasubramanian, M. K. (2005). The 14-3-3 protein rad24p modulates function of the cdc14p family phosphatase clp1p/flp1p in fission yeast. *Curr Biol* **15**, 1376-83.

Mishra, M., Karagiannis, J., Trautmann, S., Wang, H., McCollum, D. and Balasubramanian, M. K. (2004). The Clp1p/Flp1p phosphatase ensures completion of cytokinesis in response to minor perturbation of the cell division machinery in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **117**, 3897-910.

Mishra, M. and Oliferenko, S. (2008). Cytokinesis: catch and drag. *Curr Biol* **18**, R247-50.

Mitchison, J. M. and Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **75**, 357-76.

Moon, S. Y. and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**, 13-22.

Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.

Mori, K., Amano, M., Takefuji, M., Kato, K., Morita, Y., Nishioka, T., Matsuura, Y., Murohara, T. and Kaibuchi, K. (2009). Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *J Biol Chem* **284**, 5067-76.

Morrell-Falvey, J. L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G. D. and Gould, K. L. (2005). Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J Cell Sci* **118**, 5563-73.

Morrell, J. L., Tomlin, G. C., Rajagopalan, S., Venkatram, S., Feoktistova, A. S., Tasto, J. J., Mehta, S., Jennings, J. L., Link, A., Balasubramanian, M. K. et al. (2004). Sid4p-Cdc11p assembles the septation initiation network and its regulators at the *S. pombe* SPB. *Curr Biol* **14**, 579-84.

Moseley, J. B., Mayeux, A., Paoletti, A. and Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* **459**, 857-60.

Moser, B. A. and Russell, P. (2000). Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* **3**, 631-6.

Motegi, F., Mishra, M., Balasubramanian, M. K. and Mabuchi, I. (2004). Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by Mid1 in fission yeast. *J Cell Biol* **165**, 685-95.

Mulvihill, D. P., Edwards, S. R. and Hyams, J. S. (2006). A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton* **63**, 149-61.

Murone, M. and Simanis, V. (1996). The fission yeast *dma1* gene is a component of the spindle assembly checkpoint, required to prevent septum formation and premature exit from mitosis if spindle function is compromised. *EMBO J* **15**, 6605-16.

Mutoh, T., Nakano, K. and Mabuchi, I. (2005). Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* **10**, 1189-202.

Nakano, K., Arai, R. and Mabuchi, I. (1997). The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **2**, 679-94.

Nakano, K. and Mabuchi, I. (1995). Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding Rho proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **155**, 119-22.

Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. and Mabuchi, I. (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* **8**, 357-70.

Nakano, K., Mutoh, T. and Mabuchi, I. (2001). Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **6**, 1031-42.

Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 21-32.

Novak, B., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Chen, K. and Tyson, J. J. (1998). Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophys Chem* **72**, 185-200.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**, 503-8.

Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* **79**, 547-50.

Nurse, P., Thuriaux, P. and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **146**, 167-78.

Ohkura, H., Hagan, I. M. and Glover, D. M. (1995). The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase *plp1*, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev* **9**, 1059-73.

Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**, 545-54.

Paoletti, A. and Chang, F. (2000). Analysis of *mid1p*, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell* **11**, 2757-73.

Park, H. O. and Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 48-96.

Pelham, R. J. and Chang, F. (2002). Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* **419**, 82-6.

Peng, X., Karuturi, R. K., Miller, L. D., Lin, K., Jia, Y., Kondu, P., Wang, L., Wong, L. S., Liu, E. T., Balasubramanian, M. K. et al. (2005). Identification of cell cycle-regulated genes in fission yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 1026-42.

Perez, P. and Rincon, S. A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* **426**, 243-53.

Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-56.

Petersen, J., Paris, J., Willer, M., Philippe, M. and Hagan, I. M. (2001). The *S. pombe* aurora-related kinase *Ark1* associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *J Cell Sci* **114**, 4371-84.

Petit, C. S., Mehta, S., Roberts, R. H. and Gould, K. L. (2005). *Ace2p* contributes to fission yeast septin ring assembly by regulating *mid2+* expression. *J Cell Sci* **118**, 5731-42.

Piekny, A., Werner, M. and Glotzer, M. (2005). Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* **15**, 651-8.

Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. and Narumiya, S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* **271**, 13556-60.

Roberts-Galbraith, R. H., Chen, J. S., Wang, J. and Gould, K. L. (2009). The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *J Cell Biol* **184**, 113-27.

Rosenberg, J. A., Tomlin, G. C., McDonald, W. H., Snyderman, B. E., Muller, E. G., Yates, J. R., 3rd and Gould, K. L. (2006). Ppc89 links multiple proteins, including the septation initiation network, to the core of the fission yeast spindle-pole body. *Mol Biol Cell* **17**, 3793-805.

Rossman, K. L., Der, C. J. and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-80.

Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lio, P., Penkett, C. J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P. and Bahler, J. (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* **36**, 809-17.

Salimova, E., Sohrmann, M., Fournier, N. and Simanis, V. (2000). The *S. pombe* orthologue of the *S. cerevisiae* *mob1* gene is essential and functions in signalling the onset of septum formation. *J Cell Sci* **113** (Pt 10), 1695-704.

Sambrook, J.F., E.F. and Maniatis, T. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, B., Martin-Cuadrado, A. B., Vazquez de Aldana, C. R., del Rey, F. and Perez, P. (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell* **4**, 1639-45.

Sayers, L. G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T. and Parker, P. J. (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells* **5**, 17-27.

Schmidt, A. and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-609.

Schmidt, S., Sohrmann, M., Hofmann, K., Woollard, A. and Simanis, V. (1997). The Spg1p GTPase is an essential, dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* **11**, 1519-34.

Sengar, A. S., Markley, N. A., Marini, N. J. and Young, D. (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **17**, 3508-19.

Shirayama, M., Matsui, Y., Tanaka, K. and Toh-e, A. (1994). Isolation of a CDC25 family gene, MSI2/LTE1, as a multicopy suppressor of *ira1*. *Yeast* **10**, 451-61.

Simanis, V. (2003). Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J Cell Sci* **116**, 4263-75.

Skau, C. T., Neidt, E. M. and Kovar, D. R. (2009). Role of tropomyosin in formin-mediated contractile ring assembly in fission yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 2160-73.

Sohrmann, M., Fankhauser, C., Brodbeck, C. and Simanis, V. (1996). The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2707-19.

Sohrmann, M., Schmidt, S., Hagan, I. and Simanis, V. (1998). Asymmetric segregation on spindle poles of the *Schizosaccharomyces pombe* septum-inducing protein kinase Cdc7p. *Genes Dev* **12**, 84-94.

Song, K., Mach, K. E., Chen, C. Y., Reynolds, T. and Albright, C. F. (1996). A novel suppressor of *ras1* in fission yeast, *byr4*, is a dosage-dependent inhibitor of cytokinesis. *J Cell Biol* **133**, 1307-19.

Sopko, R., Huang, D., Smith, J. C., Figeys, D. and Andrews, B. J. (2007). Activation of the Cdc42p GTPase by cyclin-dependent protein kinases in budding yeast. *EMBO J* **26**, 4487-500.

Sparks, C. A., Morpew, M. and McCollum, D. (1999). Sid2p, a spindle pole body kinase that regulates the onset of cytokinesis. *J Cell Biol* **146**, 777-90.

Stark, B. C., Sladewski, T. E., Pollard, L. W. and Lord, M. (2010). Tropomyosin and myosin-II cellular levels promote actomyosin ring assembly in fission yeast. *Mol Biol Cell* **21**, 989-1000.

Tajadura, V., Garcia, B., Garcia, I., Garcia, P. and Sanchez, Y. (2004). *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall beta-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J Cell Sci* **117**, 6163-74.

Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.

Takaine, M., Numata, O. and Nakano, K. (2009). Fission yeast IQGAP arranges actin filaments into the cytokinetic contractile ring. *EMBO J* **28**, 3117-31.

Tanaka, K., Petersen, J., MacIver, F., Mulvihill, D. P., Glover, D. M. and Hagan, I. M. (2001). The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **20**, 1259-70.

Tasto, J. J., Morrell, J. L. and Gould, K. L. (2003). An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol* **160**, 1093-103.

Tomlin, G. C., Morrell, J. L. and Gould, K. L. (2002). The spindle pole body protein Cdc11p links Sid4p to the fission yeast septation initiation network. *Mol Biol Cell* **13**, 1203-14.

Toure, A., Mzali, R., Liot, C., Seguin, L., Morin, L., Crouin, C., Chen-Yang, I., Tsay, Y. G., Dorseuil, O., Gacon, G. et al. (2008). Phosphoregulation of MgcRacGAP in mitosis involves Aurora B and Cdk1 protein kinases and the PP2A phosphatase. *FEBS Lett* **582**, 1182-8.

Tran, P. T., Doye, V., Chang, F. and Inoue, S. (2000). Microtubule-dependent nuclear positioning and nuclear-dependent septum positioning in the

fission yeast *Schizosaccharomyces* [correction of *Saccharomyces*] *pombe*. *Biol Bull* **199**, 205-6.

Trautmann, S., Wolfe, B. A., Jorgensen, P., Tyers, M., Gould, K. L. and McCollum, D. (2001). Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Curr Biol* **11**, 931-40.

Vardy, L., Fujita, A. and Toda, T. (2002). The gamma-tubulin complex protein Alp4 provides a link between the metaphase checkpoint and cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* **7**, 365-73.

Vavylonis, D., Wu, J. Q., Hao, S., O'Shaughnessy, B. and Pollard, T. D. (2008). Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science* **319**, 97-100.

Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-304.

Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-51.

West, R. R., Vaisberg, E. V., Ding, R., Nurse, P. and McIntosh, J. R. (1998). cut11(+): A gene required for cell cycle-dependent spindle pole body anchoring in the nuclear envelope and bipolar spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **9**, 2839-55.

Wheatley, S. P., Hinchcliffe, E. H., Glotzer, M., Hyman, A. A., Sluder, G. and Wang, Y. (1997). CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis in vivo. *J Cell Biol* **138**, 385-93.

Wolfe, B. A. and Gould, K. L. (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *EMBO J* **23**, 919-29.

Wolfe, B. A. and Gould, K. L. (2005). Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol* **15**, 10-8.

Wolfe, B. A., Takaki, T., Petronczki, M. and Glotzer, M. (2009). Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCyk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation. *PLoS Biol* **7**, e1000110.

Wood, V. Gwilliam, R. Rajandream, M. A. Lyne, M. Lyne, R. Stewart, A. Sgouros, J. Peat, N. Hayles, J. Baker, S. et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-80.

Wu, J. Q., Bahler, J. and Pringle, J. R. (2001). Roles of a fimbrin and an alpha-actinin-like protein in fission yeast cell polarization and cytokinesis. *Mol Biol Cell* **12**, 1061-77.

Wu, J. Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell* **5**, 723-34.

Wu, J. Q. and Pollard, T. D. (2005). Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science* **310**, 310-4.

Wu, J. Q., Sirotkin, V., Kovar, D. R., Lord, M., Beltzner, C. C., Kuhn, J. R. and Pollard, T. D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol* **174**, 391-402.

Yamano, H., Gannon, J. and Hunt, T. (1996). The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **15**, 5268-79.

Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X. and Marcus, S. (2003). The novel Rho GTPase-activating protein family protein, Rga8, provides a potential link between Cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **278**, 48821-30.

Yoshida, M. and Sazer, S. (2004). Nucleocytoplasmic transport and nuclear envelope integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods* **33**, 226-38.

Zaitsevska-Carter, T. and Cooper, J. A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *EMBO J* **16**, 1318-31.

Zerial, M. and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17.

Zheng, X. D., Lee, R. T., Wang, Y. M., Lin, Q. S. and Wang, Y. (2007). Phosphorylation of Rga2, a Cdc42 GAP, by CDK/Hgc1 is crucial for *Candida albicans* hyphal growth. *EMBO J* **26**, 3760-9.